

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES

PAR
AMÉLIE ST-ARNEAULT

RECHERCHE DE PROTÉINES EXPORTÉES CHEZ *ACTINOBACILLUS*
PLEUROPNEUMONIAE PAR LA TECHNOLOGIE DE FUSION AVEC LA
PHOSPHATASE ALCALINE

JUIN 2003

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier :

- mon directeur de recherche, Dr Marc Sirois, pour sa disponibilité et sa rigueur ;
- le FCAR du gouvernement du Québec pour la bourse de maîtrise en recherche ;
- la Fondation du Centre des Études Universitaires de l'Université du Québec à Trois-Rivières pour la bourse d'études ;
- Luc Gagnon, stagiaire post-doctoral, pour ses conseils techniques ;
- Julie Provencher pour la poursuite du projet PhoA ;
- mes collègues de la maîtrise pour leur joie de vivre et leur dynamisme ;
- mon conjoint et ma famille pour m'avoir soutenue moralement pendant mes études.

À ma petite Marianne... J'espère que tu sauras trouver ton chemin dans le vaste pays de la connaissance.

RÉSUMÉ

La pleuropneumonie porcine est une maladie infectieuse hautement contagieuse. Les vaccins actuels étant peu efficaces et la virulence non complètement élucidée, le laboratoire de recherche du Dr Marc Sirois s'active à caractériser la virulence de la bactérie *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Le présent ouvrage est consacré à l'utilisation d'un vecteur plasmidique de fusion, pHRM104. Ce plasmide, qui contient le gène tronqué de la phosphatase alcaline ('*phoA*) d'*Escherichia coli*, permet la mise en évidence de protéines bactériennes exportées. Parmi ces protéines, il est possible de sélectionner des antigènes. Puisque le génome d'App n'est toujours pas complètement décodé, certaines de ces protéines antigéniques ne sont pas identifiées. Cette technologie est donc très prometteuse et pourrait permettre la mise au point d'un nouveau vaccin plus efficace pour prévenir la pleuropneumonie porcine.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	II
RÉSUMÉ.....	III
TABLE DES MATIÈRES.....	IV
LISTE DES TABLEAUX.....	VII
LISTE DES FIGURES.....	VIII
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS.....	IX
INTRODUCTION.....	1
 CHAPITRE I <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> : historique, aspects cliniques et caractéristiques microbiologiques de l'agent causal.....	 1
1.1 Introduction et historique.....	1
1.2 Agent causal.....	2
1.3 Autres formes majeures de pneumonie porcine.....	4
1.4 Aspects cliniques.....	5
1.4.1 Transmission de la pleuropneumonie porcine à App.....	5
1.4.2 Période d'incubation de la maladie.....	6
1.5 Manifestations cliniques.....	6
1.5.1 Lésions macroscopiques.....	8
1.5.2 Lésions microscopiques.....	8
1.6 Caractéristiques microbiologiques de l'agent causal.....	9

CHAPITRE II La pleuropneumonie porcine : le rôle des facteurs de virulence dans la pathogénie et la protection contre la maladie.....12

2.1	Pathogénie, immunité et vaccination.....	12
2.2.1	Rôle des facteurs de virulence dans la pathogénie et la protection contre l'infection.....	15
2.2.1	capsule.....	15
2.2.2	Lipopolysaccharides.....	16
2.2.3	Protéines de la membrane externe.....	17
2.2.4	Protéines liant les transferrines.....	17
2.2.5	Protéases.....	18
2.2.6	Toxines Apx.....	18
2.2.7	Adhésines.....	23
2.3	Conclusion.....	23

CHAPITRE III Identification de gènes codant pour des protéines exportées chez *Actinobacillus pleuropneumoniae* par la technologie PhoA.....25

3.1	Les antigènes et le criblage immunologique différentiel.....	25
3.2	La technologie PhoA et les protéines exportées.....	26
3.3	Avantages de la technique.....	30
3.4	Réalisations	30
3.5	Utilisation du vecteur pHRM104 : étude d'App sérotype 1.....	31

CHAPITRE IV MATÉRIEL ET MÉTHODES	32
4.1 Construction de la banque génomique d'App 4074 (ATCC 27088) dans le vecteur pHRM104.....	32
4.2 Résultats.....	35
4.3 Cheminement.....	36
4.4 Sélection des clones.....	37
4.5 Préparation des clones pour les gels de polyacrylamide (SDS-PAGE, système d'électrophorèse Mini-PROTEAN II Cell de Bio-rad).....	37
4.5.1 Préparation des solutions pour l'électrophorèse SDS-PAGE	39
4.5.2 Transfert du gel sur membrane de nitrocellulose (Trans-Blot SD Semi-dry transfer de Bio-rad).....	40
4.5.3 Protocole pour le transfert de protéines (SDS-PAGE).....	40
4.5.4 Immunobuvardage de type Western.....	41
4.5.5 Test préliminaire des anticorps (par dot-blot).....	41
4.5.6 Dot-blot pour les sérums porcins.....	42
4.5.7 Analyse des résultats.....	43
4.5.8 Discussion.....	43
4.5.9 Réaction Ag-Ac.....	44
4.5.10 Résultats.....	44
DISCUSSION.....	49
CONCLUSION.....	53
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	54

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1.1	Principales différences entre trois formes majeures de pneumonie porcine	5
TABLEAU 1.2	Description de <i>H. pleuropneumoniae</i> par Matthews et Pattison (1961) et Shope (1964).....	10
TABLEAU 2.1	Génotypes pour les toxines Apx et phénotypes observés (Frey, J., 1995a).....	20
TABLEAU 4.1	Digestions enzymatiques.....	33
TABLEAU 4.2	Ligation pHRM104 / inserts d'App 4074.....	34
TABLEAU 4.3	Essais d'électroporation.....	35
TABLEAU 4.4	Résumé des résultats obtenus après la troisième électroporation.....	36
TABLEAU 4.5	Préparation du gel séparateur 10 %.....	38
TABLEAU 4.6	Préparation du gel de compression 4%.....	38
TABLEAU 4.7	Résultats obtenus après le « Western blot » et décision quant au séquençage.....	45
TABLEAU 4.8	Description après séquençage des 41 clones séro-réacteurs.....	47
TABLEAU 4.9	Description après séquençage des 20 clones non séro-réacteurs.	48
TABLEAU 4.10	Résumé des résultats obtenus.....	48

LISTE DES FIGURES

FIGURES 1.1 a) et b)	L'anatomie du système respiratoire porcin.....7
FIGURES 1.2 a) à c)	Lésions caractéristiques de la pleuropneumonie porcine à App.....9
FIGURE 3.1	La paroi des bactéries Gram-négatif (microscopie électronique).....27
FIGURE 3.2	Transformation du XP (substrat de la phosphatase alcaline) en un produit coloré.....29

LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
App	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
Apx	Toxines d' <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
G + C	Guanine et cytosine
IgA	Immunoglobuline de type A
kpb	Kilopaire(s) de bases
LPS	Lipopolysaccharides
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
OmlA	Lipoprotéine de la membrane externe A
OMP	Protéines de la membrane externe
PalA	Protéine associée au peptidoglycane A
PhoA	Phosphatase alcaline
RTX	Toxines formant des pores
Tbp	Protéine liant les transferrines
ufc	Unité formatrice de colonie
XP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate

INTRODUCTION

CHAPITRE I

***Actinobacillus pleuropneumoniae* : historique, aspects cliniques et caractéristiques microbiologiques de l'agent causal**

1.1 Introduction et historique

La bactérie *Actinobacillus pleuropneumoniae* cause la pleuropneumonie porcine contagieuse, une maladie largement distribuée dans le monde entier. Cette maladie entraîne des pertes considérables au sein de l'industrie porcine (Nicolet, J., 1992). La pleuropneumonie porcine est caractérisée par une pneumonie nécro-hémorragique et une pleurésie fibrineuse. Les vaccins actuels sont peu efficaces et un contrôle plus adéquat de cette infection requiert une meilleure connaissance des facteurs de virulence de la bactérie et une meilleure compréhension des diverses étapes du déroulement de la maladie.

Les premières présomptions de la pleuropneumonie porcine datent de 1957 et 1961 et viennent de Grande-Bretagne (Barnum, D. A., 1990). En 1957, Pattison *et al.* isolent, de lésions de pleuropneumonie porcine, une bactérie exigeante en NAD qui sera nommée *Haemophilus-like* avant d'être inscrite sur la liste officielle des dénominations bactériennes sous le nom de *Haemophilus pleuropneumoniae* (Euzéby, J. P., 1998). Par la suite, divers travaux relatent la présence de cette bactérie dans plusieurs pays tels que la Suisse, le Danemark, l'Australie et le Japon. Elle est maintenant répandue à travers le monde entier. Au

Canada, le premier cas rapporté nous est parvenu de la Saskatchewan, en 1974. Au Québec, des pertes économiques importantes ont commencé à être enregistrées à partir de 1978. Les facteurs responsables des épidémies de pleuropneumonie porcine sont : les élevages en rotation, le grand nombre d'animaux dans le même bâtiment et l'acquisition de porcelets de plusieurs sources différentes et/ou inconnues.

1.2 Agent causal

Actinobacillus pleuropneumoniae (App) est un petit bacille Gram négatif encapsulé avec une morphologie de type coccobacille (Nicolet, J., 1992). Sur la base des besoins en nicotinamide adénine dinucléotide (NAD), App peut être divisé en deux biotypes : le biotype 1 qui est dépendant du NAD et le biotype 2 qui est indépendant du NAD. Quatorze sérotypes ont été décrits (Byrd, W. et Kadis, S., 1989). Les sérotypes 1 et 5 sont subdivisés respectivement en 1a et 1b, et en 5a et 5b (Jolie, R. A. V. *et al.*, 1994). Le sérotypage est principalement basé sur les antigènes capsulaires; les sérotypes ont aussi des différences au niveau de la composition en lipopolysaccharides (LPS). Les sérotypes 1, 9 et 11, les sérotypes 3, 6 et 8 et les sérotypes 4 et 7 ont des épitopes (déterminants antigéniques) communs. Bien qu'il soit clair que tous les sérotypes causent la pleuropneumonie porcine, la virulence varie au gré des sérotypes. Les observations et les infections expérimentales démontrent que les souches de biotype 2 sont moins virulentes que les souches de biotype 1. Les sérotypes les plus virulents sont : 1a, 1b, 5a, 5b, 9 et 10.

App appartient à la famille des *Pasteurellaceae* (qui regroupe les genres *Actinobacillus*, *Haemophilus*, *Mannheimia* et *Pasteurella*), composée de bactéries Gram-négatives et anaérobie facultatif (Kilian, M. *et al.*, 1984). Pittman, en 1953, l'a d'abord classifiée comme

Haemophilus parahaemolyticus, une bactérie d'origine humaine. Chez l'humain, cette dernière est responsable de diverses infections (pharyngites, endocardites...), requiert le facteur sanguin V (NAD) et produit une hémolyse sur gélose au sang. C'est d'après ces caractéristiques que la bactérie d'origine porcine avait été classifiée. En 1978, on changea son nom pour *H. pleuropneumoniae*, lequel avait été utilisé en 1961 par Matthews et Pattison, et en 1964 par Shope. On a démontré que *H. pleuropneumoniae* et *H. parahaemolyticus* avaient des différences biochimiques et génétiques (% G + C) et que *H. pleuropneumoniae* n'était pas nécessairement hémolytique. En 1983, le nom de *H. pleuropneumoniae* changea pour *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Kilian, M. *et al.*, 1984). Une étude phylogénétique basée sur la comparaison des séquences de l'ARNr 16S de 54 souches appartenant à la famille des *Pasteurellaceae* démontre que *H. pleuropneumoniae* se classe dans le groupe principalement constitué d'autres *Actinobacillus* (*A. suis*, *A. equuli*, *A. ureae*, *A. lignieresii* et *H. parahaemolyticus*) (De Ley, J. *et al.*, 1990). L'espèce *A. actinomycetemcomitans*, l'espèce type du genre *Actinobacillus*, se regrouperait plutôt avec le genre *Haemophilus*; cette bactérie cause surtout des périodontites chez l'humain.

La prévalence des différents sérotypes, au Québec, a été étudiée grâce à diverses techniques telles que l'agglutination sur lame, l'agglutination en tube, la précipitation en anneau, la coagglutination, l'immunodiffusion, l'hémagglutination indirecte et l'immunoélectrophorèse (Mittal, K. R. *et al.*, 1992). Les antisérums sont préparés en utilisant le lapin comme hôte et les souches de référence des douze différents sérotypes ont été utilisées à titre d'antigènes. Le sérotype 1 est prédominant depuis 10 ans (55-87 % des isolats) tandis que le sérotype 5 arrive au second rang (9-30 %). Les sous-types 5a et 5b sont tous les deux présents au Québec. Les sérotypes 3, 6, 7, 8, 10 et 12 ne sont isolés qu'en de rares occasions (9 % des isolats) alors que les sérotypes 4, 9 et 11 ne sont pas présents.

Des réactions croisées sont observées entre les sérotypes 3, 6, 8, et 1, 9, 11. Les isolats obtenus proviennent des cavités nasales ou des amygdales du porc (Mittal, K. R. *et al.*, 1983, 1988 et 1990). Depuis quelques années, des efforts sont investis dans l'étude des mécanismes de virulence afin de mieux comprendre comment App infecte son hôte habituel, le porc. Les principaux facteurs connus à ce jour qui contribuent à la virulence d'App seront abordés au chapitre 2.

1.3 Autres formes majeures de pneumonie chez le porc

La pneumonie porcine peut être d'origine bactérienne, virale ou parasitaire (Lawhorn, B. 1998). Parmi les bactéries, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, App et *Salmonella choleraesuis* sont les plus rencontrées. En ce qui concerne les virus, le virus porcin de l'influenza, le coronavirus porcin et le virus PRV (pseudorabies virus) sont les plus fréquents. Les symptômes varient selon l'agent causal. Le tableau 1.1 présente les principales différences entre trois formes majeures de pneumonie porcine.

TABLEAU 1.1

Principales différences entre trois formes majeures de pneumonie porcine

Caractéristiques	<i>Pasteurella</i> forme pneumonie	<i>Pasteurella</i> forme pleurésie	App
Signes cliniques	Absents en général	Toux, dyspnée	Toux, dyspnée
Mortalité	+	++	++
Conditions corporelles	Bonnes	Anorexie	Bonnes
Pleurésie	Non	Oui, peu humide et translucide	Oui, humide et opaque
Abcès	Non	Oui	Oui
Atteinte des lobes antérieurs	Oui	Oui	Non
Atteinte des lobes du diaphragme	Non	Non	Oui
Friabilité pulmonaire	Non	Non	Oui

1.4 Aspects cliniques

1.4.1 Transmission de la pleuropneumonie porcine à App

Les porcs susceptibles acquièrent l'infection par inhalation de la bactérie. Celle-ci est introduite dans les élevages par des sujets qui, malgré l'absence de signes cliniques, sont porteurs de la bactérie. Un contact assez étroit entre les animaux paraît nécessaire pour qu'il y ait transmission de l'agent. De plus, l'air contaminé provenant d'un local adjacent pourrait permettre la transmission (Euzéby, J. P., 1998).

1.4.2 Période d'incubation de la maladie

Le temps entre le moment de l'infection et l'apparition des premiers symptômes est variable. La période peut être aussi courte que douze heures pour des porcs qui n'ont jamais été contaminés ou en contact. Dans d'autres cas, cette période d'incubation variera de quelques jours à quelques semaines. Les facteurs qui entrent en ligne de compte sont : la virulence de la souche infectante, l'état immunitaire de l'animal, sa résistance naturelle à l'agent causal et la régie d'élevage (Euzéby, J. P., 1998).

1.5 Manifestations cliniques

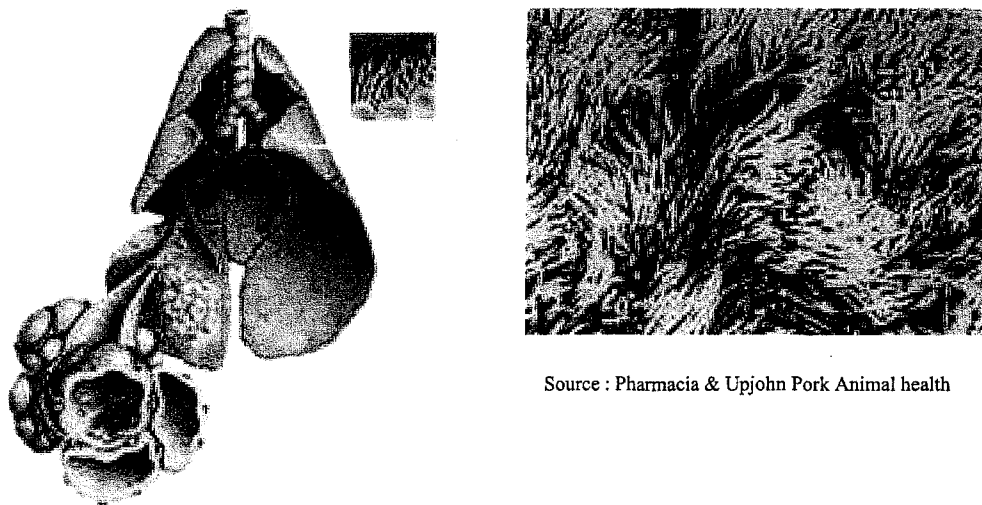
Le système respiratoire de l'animal sain (narines, larynx, trachée, bronches, bronchioles et alvéoles) peut être décrit de la façon suivante : les narines ne présentent pas d'écoulement ou d'inflammation, les canaux des glandes lacrymales (qui se déversent dans la cavité nasale) ne sont pas obstrués, les sécrétions lacrymales sont normales, la toux est absente et la respiration normale. De plus, les amygdales et les ganglions lymphatiques sont normaux.

L'anatomie du système respiratoire porcin (figures 1.1 a) et b)) permet à l'animal de se défendre contre les micro-organismes : les cils et le mucus permettent l'expulsion des micro-organismes par les voies naturelles, les amygdales de l'oropharynx contiennent des cellules du système immunitaire qui luttent contre ces micro-organismes et les macrophages alvéolaires constituent une ligne de défense importante.

FIGURES 1.1

L'anatomie du système respiratoire porcin

a) Niveaux d'organisation du système respiratoire b) Cils de l'épithélium respiratoire



Source : Pharmacia & Upjohn Pork Animal health

Les signes cliniques de l'animal infecté varient selon la virulence de la souche, le statut immunitaire des animaux et les conditions de régie. Ces facteurs font en sorte que la maladie pourra être suraiguë, aiguë, chronique ou subclinique (détectable uniquement par l'augmentation de la concentration des anticorps). La forme chronique est associée à une atteinte localisée de type pleurésie fibrineuse, tandis que la forme aiguë entraîne des lésions nécro-hémorragiques et mène généralement à la mort (Min, K. *et al.*, 1998). Un animal atteint de façon suraiguë peut mourir en quelques heures même s'il semblait sain au départ. Les signes cliniques habituels sont : la toux, la fièvre (40,5 °C à 42,0 °C), l'abattement, la dyspnée et l'anorexie. Après la mort de l'animal, des écoulements sanguinolents au niveau des narines et la cyanose aux extrémités et à l'abdomen sont fréquents. Les formes chroniques se manifestent par un retard de croissance et une toux occasionnelle. Notons que la maladie frappe les sujets de tous les âges sans exception (Euzéby, J. P. , 1998).

1.5. 1 Lésions macroscopiques (figures 1.2 a) à c))

Lors de la nécropsie, des zones pulmonaires de couleur rouge noir, fermes, non affaissées, avec adhérences fibrineuses entre les plèvres sont observées. Les lésions sont plus fréquentes au niveau des lobes caudaux. Un œdème interlobulaire est évident. L'inflammation du péricarde, avec présence de fibrine, n'est pas rare. Les ganglions bronchiques et médiastinaux sont gonflés. Dans les cas plus chroniques, il y a pleurésie fibrineuse abcédative (Euzéby, J. P., 1998).

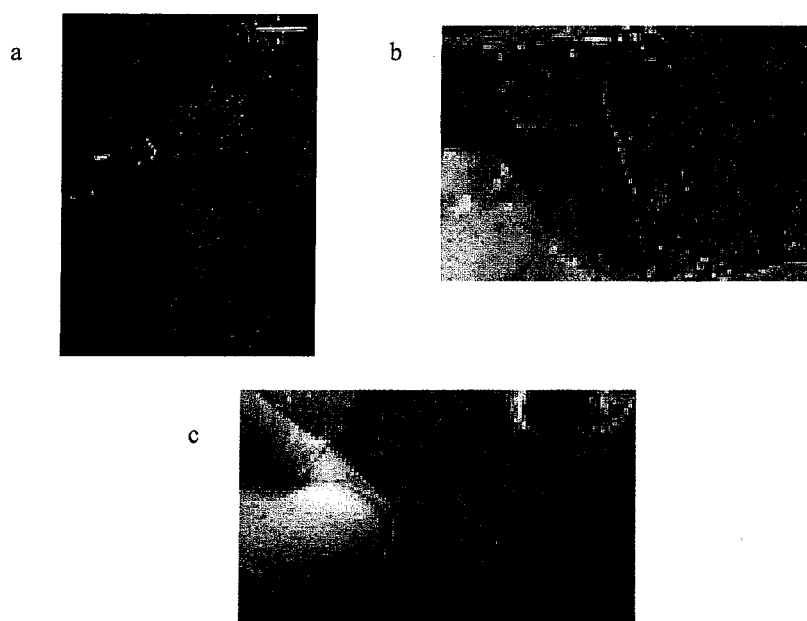
1.5.2 Lésions microscopiques

Lors de l'examen histopathologique, nous retrouvons la présence de nombreux thrombi fibrineux dans plusieurs vaisseaux à travers les poumons. Une congestion intense des capillaires alvéolaires et le gonflement des vaisseaux lymphatiques sont aussi observés. Les macrophages et les lymphocytes sont nombreux alors que les neutrophiles sont presque absents.

FIGURES 1.2 a) à c)

Lésions caractéristiques de la pleuropneumonie porcine à App

Lésions nécro-hémorragiques (a et b), pleurésie (c).



1.6 Caractéristiques microbiologiques de l'agent causal

Kilian *et al.*(1978) ont décrit les principales caractéristiques microbiologiques de l'agent causal. Afin d'isoler App, un milieu enrichi de facteur V est requis. Le facteur V est retrouvé dans les globules rouges. Il s'agit de la coenzyme NAD impliquée dans les réactions d'oxydoréduction. Les érythrocytes renferment le facteur V mais le sang des mammifères contient aussi des inhibiteurs de ce dernier. On doit alors supprimer leur action par chauffage à 80 °C pendant 10-15 minutes ou ajouter le facteur en excès. Lors de la préparation de la gélose chocolatée, on détruit les inhibiteurs et on rend disponible le facteur V en lysant les érythrocytes. Les colonies bactériennes obtenues après ensemencement sont rondes, blanches

et luisantes. La température optimale de croissance est de 37 °C et une atmosphère de 5 % en dioxyde de carbone peut faciliter l'isolement.

Le diagnostic peut être fait en constatant les lésions macroscopiques après la mort de l'animal. Chez l'animal vivant, des prélèvements peuvent être faits et la bactérie peut être cultivée et isolée sur milieu de culture (gélose chocolatée, au sang ou nutritive enrichie de facteur V). App possède aussi différentes caractéristiques pouvant faciliter son identification (tableau 1.2).

TABLEAU 1.2

Description de *H. pleuropneumoniae* par Matthews et Pattison (1961) et Shope (1963)

Test	Résultat
Coloration de Gram	Négatif
Uréase	Positif
Phosphatase alcaline	Positif
Hémolyse	Positif
β-galactosidase	Positif
Production de porphyrines à partir de l'acide delta-aminolévulinique	Positif
Production d'acide acétique	Positif
Production d'acide lactique	Positif
Production d'acide succinique	Positif
Besoin en facteurs sanguins (V et X)	V : positif X : négatif
Réduction des nitrates	Positif

Il est important de savoir que ces tests ne permettent d'obtenir des résultats qu'en 3-4 jours. Lorsque le pathogène peut être disséminé pendant cette période, ce type de diagnostic peut s'avérer trop lent pour prévenir une épidémie. Pour les cas chroniques ou afin de tester un troupeau, nous pouvons rechercher la présence d'anticorps anti-App dans les sérums porcins

ou la présence d'antigènes sérotype-spécifique au niveau pulmonaire (Larson, D. J. *et al.*, 1994).

CHAPITRE II

La pleuropneumonie porcine : le rôle des facteurs de virulence dans la pathogénie et la protection contre la maladie

2.1 Pathogénie, immunité et vaccination

La pathogénie de la pleuropneumonie porcine est complexe et multifactorielle (Nicolet, J., 1992) et conséquemment n'est toujours pas entièrement élucidée. App est inhalée et pénètre dans les alvéoles pulmonaires via la trachée et les bronches. Mis à part les facteurs environnementaux et la susceptibilité de l'hôte, différents facteurs de virulence d'App incluant la capsule, l'endotoxine (LPS), les exotoxines (toxines Apx), les adhésines, les protéines liant les transferrines, les protéines de la membrane externe et les protéases jouent un rôle important dans la pathogénie (Tascon, R. I. *et al.*, 1996). Des infections concomitantes causées par d'autres pathogènes du tractus respiratoire pourraient aussi favoriser le développement de la pleuropneumonie porcine (Nicolet, J., 1992).

Les infections naturelles ou expérimentales stimulent la réponse immunitaire. Les anticorps circulants peuvent être détectés grâce au test de fixation du complément fait 10 jours après l'infection expérimentale. Le titre d'anticorps atteint son maximum après 3 à 4 semaines et persiste pendant plusieurs mois. L'injection d'antisérums protège les porcs contre la bactérie ce qui indique une réponse immunitaire systémique contre App.

Par contre, l'immunité cellulaire ne serait pas essentielle pour la protection (Bossé, J. T. *et al.*, 1992 ; Jansen, R., 1994). Les immunoglobulines de type G seraient les principaux

médiateurs de l'immunité humorale (Devenish, J. *et al*, 1990 ; Bossé, J. T. *et al*, 1992 ; Byrd, W. et Kadis, S., 1992 ; Jansen, R., 1994). La truie protégée confère une immunité passive à sa portée. Les anticorps retrouvés au niveau du colostrum peuvent persister environ 5-12 semaines, mais la protection ne semble pas dépasser trois semaines (Nicolet, J., 1992).

Les macrophages alvéolaires et les neutrophiles sont des acteurs importants des défenses immunitaires pulmonaires. La phagocytose d'App par ces derniers semble se dérouler exclusivement en présence d'anticorps dirigés contre les antigènes de surface d'App. Les macrophages meurent après la phagocytose et ce, en dépit des anticorps dirigés contre les toxines Apx. Or, ces mêmes anticorps semblent protéger les neutrophiles et ces derniers détruisent efficacement les bactéries ingérées (Cruijssen T. L. M. *et al*, 1992 ; Jansen, R., 1994). Il a été démontré que des anticorps dirigés contre les LPS, la capsule et les protéines de la membrane externe agissent comme des opsonines, stimulant la phagocytose d'App par les neutrophiles (Thwaites, R. N. et Kadis, S., 1991 ; Byrd, W. et Kadis, S., 1992). Toutefois, la lyse bactérienne via le complément n'a pas été mise en évidence (Rycroft, A. N. et Cullen, J. M., 1990).

Dans une étude plus récente au sujet de la protection croisée entre les sérotypes (Haesebrouck, F. *et al* , 1996), quatre groupes de porcs nés par césarienne et privés de colostrum ont été inoculés de façon intranasale avec App biotype 1 sérotype 2 (produisant les toxines Apx II et Apx III ; six porcs), App biotype 1 sérotype 10 (produisant la toxine Apx I ; cinq porcs), App biotype 2 sérotype 2 (produisant la toxine Apx II ; cinq porcs) et de la saline (contrôles ; sept porcs). Par la suite, tous les porcs ont été exposés à App biotype 1 sérotype 2. Après la stimulation, les signes cliniques de la pleuropneumonie ont été observés chez un porc contrôle, un porc immunisé avec App biotype 1 sérotype 10 et deux porcs immunisés avec

App biotype 2 sérotype 2. Ces porcs sont décédés 36 heures après l'exposition et 20-50 % de leurs poumons étaient atteints de façon macroscopique. Chez les autres porcs, les signes cliniques étaient légers ou absents et peu ou pas de lésions macroscopiques ont été observées après euthanasie (48 heures après l'exposition). Après l'exposition, des anticorps dirigés contre Apx I seulement, Apx II seulement, Apx II et Apx III ont été retrouvés dans les sérums des porcs ayant été immunisés avec App biotype 1 sérotype 10, App biotype 2 sérotype 2 et App biotype 1 sérotype 2 respectivement. Ces résultats indiquent que des mécanismes immuns autres que les anticorps neutralisant les toxines Apx sont impliqués dans la protection croisée partielle des porcs immunisés avec App biotype 1 sérotype 10 et exposés à App biotype 1 sérotype 2.

Bien que diverses préparations de bactérines contenant des cellules entières puissent réduire la mortalité après infection du porc avec App de même sérotype, la protection croisée n'est généralement pas conférée. Une explication de cette protection limitée pourrait être l'absence de certains facteurs de virulence dans ces bactérines. Un vaccin contenant les toxines Apx et la protéine de la membrane externe de 42 kDa a été commercialisé. La protection obtenue après la vaccination est plus efficace que celle induite par les bactérines et n'est pas sérotype-spécifique. Des porcs vaccinés deux fois avec ce vaccin ont développé peu ou pas de lésions pulmonaires et n'ont présenté peu ou pas de symptômes après une exposition à App sérotype 1, sérotype 2 et sérotype 9 (Kobisch, M. et van den Bosch, J. F., 1992 ; van den Bosch, J. F. *et al.*, 1992). Des essais faits en France (Pommier, P. *et al.*, 1996), aux Pays-Bas (Valks, M. M. H. *et al.*, 1996) et en Italie (Martelli, P. *et al.*, 1996) confirment que la vaccination avec les toxines Apx et la protéine de 42 kDa réduit les symptômes et les lésions de la pleuropneumonie aiguë ou chronique et améliore les paramètres de production.

2.1 Rôle des facteurs de virulence dans la pathogénie et la protection contre l'infection

Certains facteurs de virulence sont connus : capsule, LPS, OMP, Tbp, protéases, toxines Apx et adhésines (Inzana, T. J., 1990). Ils seront brièvement décrits ci-dessous.

2.1.1 Capsule

La capsule est retrouvée chez toutes les souches d'App. La structure chimique de la capsule a été élucidée et consiste principalement en des répétitions d'oligosaccharides (Beybon, L. M. *et al.*, 1993 ; Perry, M. B. *et al.*, 1990). Elle protège App contre la phagocytose et la lyse par le complément. Elle est requise pour la virulence (Inzana, T. J. *et al.*, 1988). Les anticorps dirigés contre la capsule opsonisent la bactérie et peuvent jouer un rôle dans la protection partielle sérotype-spécifique induite par la vaccination avec des bactérines. Inzana *et al.* (1991, 1993) ont démontré qu'un mutant non capsulé confère une bonne protection après une exposition à App. Or, un mutant non hémolytique mais capsulé ne confère aucune protection. Cela démontre que les toxines Apx sont plus protectrices (immunogènes) que la capsule. En 1997, le gène impliqué dans l'exportation des polysaccharides capsulaires d'App sérotype 5a a été identifié et caractérisé par Ward et Inzana.

2.1.2 Lipopolysaccharides (LPS)

Les LPS sont des constituantes majeures de la membrane externe des bactéries Gram négatives. Ils consistent en un polysaccharide et un lipide A. Le lipide A est une endotoxine. Bien que les LPS purifiés d'App puissent causer des dommages tissulaires, les lésions induites par ces LPS ne sont ni hémorragiques ni nécrotiques. Cela indique que les LPS ne

sont pas responsables des lésions typiques de la pleuropneumonie à App mais peuvent contribuer à leur formation (Fenwick, B. W. *et al.*, 1986). Les LPS peuvent potentialiser les effets des toxines Apx sur les phagocytes (Fenwick, B. W., 1994). Ils sont aussi impliqués dans l'adhésion d'App au mucus trachéal, à la trachée et à des coupes pulmonaires congelées (Paradis, S. E. *et al.*, 1994). Les porcs immunisés avec des LPS ne sont que partiellement protégés contre une exposition à App de même sérotype (Inzana, T. J. *et al.*, 1988). Les LPS pourraient jouer un rôle dans la protection partielle sérotype-spécifique qui est induite après la vaccination avec des bactérines (Bahtia, B. *et al.*, 1991).

2.2.3. Protéines de la membrane externe (OMP)

Plusieurs protéines de la membrane externe d'App sont reconnues par le sérum d'un porc convalescent à la pleuropneumonie. Des OMP spécifiques peuvent être induites dans des conditions où le fer est limité ou en ajoutant du maltose (Deneer, H. G. et Potter, A. A., 1989 a et b ; Jansen, R. *et al.*, 1994). Bien que la composition en OMP diffère pour la plupart des sérotypes d'App (Rapp, V. J. *et al.*, 1986), il a été démontré que des isolats de tous les sérotypes contiennent des protéines communes, incluant la protéine associée au peptidoglycane, Pal A, de 14 kDa (Frey, J. *et al.*, 1996), une protéine de 29/41 kDa modifiable par la chaleur, une protéine majeure qui varie de 32 à 42 kDa selon le sérotype et une protéine de 48 kDa (Cruz, W. T. *et al.*, 1996). La séquence en acides aminés de PalA révèle une forte homologie avec la protéine d'*Escherichia coli* associée au peptidoglycane, avec la protéine de la membrane externe P6 d'*Haemophilus influenzae* et avec plusieurs autres protéines de bactéries Gram négatives. Le gène *pala* est conservé et exprimé chez tous les sérotypes d'App et chez *Actinobacillus lignieresii*. Un gène très similaire est aussi présent chez *A. suis* et *A. equuli* (Frey, J. *et al.*, 1996).

L'immunisation avec des extraits de membrane externe confère une protection limitée après une exposition à App (Beaudet, R. *et al.*, 1994 ; Jansen, R. *et al.*, 1994). Une lipoprotéine de la membrane externe de 40 kD appelée OmlA est probablement présente chez tous les sérotypes d'App (Gerlach, G. F. *et al.*, 1993). Des études d'immunisation avec OmlA ont démontré que cette lipoprotéine protège contre la mortalité après infection à App de même sérotype mais ne prévient pas les lésions pulmonaires (Gerlach, G. F. *et al.*, 1993). Ceci indique que les anticorps contre OmlA peuvent contribuer, mais ne sont pas suffisants, à protéger les porcs contre App (Jansen, R. *et al.*, 1994).

2.2.4 Protéines liant les transferrines (Tbp)

Le fer est essentiel à la croissance bactérienne. Cependant, il n'est pas facilement disponible dans l'environnement extracellulaire de l'hôte à cause de sa séquestration par des glycoprotéines porcines appelées transferrines et lactoferrines (Niven, D. F. *et al.*, 1989). Plusieurs espèces d'*Actinobacillus*, d'*Haemophilus* et de *Pasteurella* possèdent des mécanismes d'acquisition du fer qui impliquent la liaison des transferrines et des lactoferrines via des récepteurs protéiques à la surface bactérienne. Ces récepteurs s'expriment lorsque les concentrations bactériennes en fer sont faibles. Ils consistent en deux protéines distinctes appelées Tbp 1 et Tbp 2. Ces dernières ne peuvent lier que les transferrines porcines. Ceci permettrait d'expliquer, en partie, le fait qu'App n'infecte que le porc. Les protéines Tbp 1 seraient probablement des protéines transmembranaires pouvant agir comme des canaux laissant passer le fer à travers la membrane externe. En ce qui concerne les Tbp 2, elles seraient des lipoprotéines ancrées à la membrane externe par des acides aminés N-terminal. Le mécanisme d'acquisition du fer suggéré par Kirby *et al.* (1995) implique la liaison et

l'extraction du fer des transferrines par l'action coordonnée de Tbp 1 et Tbp 2, le transport à travers la membrane externe par Tbp 1 et la liaison du fer à une protéine périplasmique.

Trois protéines Tbp (60, 62 et 65 kDa) ont été identifiées parmi tous les sérotypes. L'immunisation avec la protéine de 60 kDa confère une protection limitée contre l'exposition à App de même sérotype (Gerlach, G. F. *et al.*, 1992 ; Rossi-Campos, A. *et al.*, 1992). Ceci indique que les Tbp contribuent en partie à la protection des porcs contre App (Jansen, R. *et al.*, 1994).

2.2.5 Protéases

App sécrète des protéases qui dégradent la gélatine porcine, les IgA et l'hémoglobine (Negrete-Abascal, E. *et al.*, 1994 ; Mulks, M. H. *et al.*, 1984). Il a été suggéré que le clivage des IgA par les protéases puisse faciliter l'envahissement des muqueuses et que la protéolyse de l'hémoglobine puisse faciliter l'acquisition du fer. Le rôle exact des protéases dans la pathogénie de la pleuropneumonie porcine demeure encore obscur.

2.2.6 Toxines Apx

Parmi les différents sérotypes d'App, deux exotoxines hémolytiques (Apx I et Apx II) et une exotoxine non-hémolytique (Apx III) ont été décrites (Kamp, E. M. *et al.*, 1991 ; Frey, J. *et al.*, 1993 a et b, 1994 ; Dom, P. *et al.*, 1994 ; Jansen, R. *et al.*, 1994). Ces exotoxines sont toxiques pour les macrophages alvéolaires et les neutrophiles porcins (Dom, P. *et al.*, 1992b). Elles appartiennent à la famille des toxines RTX formant des pores, un groupe de toxines

protéiques qui est très répandu chez les bactéries pathogènes Gram négatives (Frey, J. *et al.*, 1994a).

Apx I est fortement cytotoxique et cytolytique. Son poids moléculaire est de 105 kDa. Auparavant, elle était appelée hémolysine I ou cytolysine I. Elle présente de fortes similitudes avec l'hémolysine α d'*Escherichia coli*. Elle est produite par les sérotypes 1, 5, 9, 10 et 11 et aussi par *A. suis* (Kamp, E. M. *et al.*, 1994). L'hémolyse d'App a été étudiée par Kilian *et al.* en 1976.

Apx II est faiblement hémolytique et faiblement cytotoxique. Auparavant, elle était appelée hémolysine II ou cytolysine II. Elle a un poids moléculaire de 103 kDa et est produite par tous les sérotypes, excepté le sérotype 10. Elle est aussi produite par *A. suis* (Kamp, E. M. *et al.*, 1994). Elle a une forte homologie (séquence en acides aminés) avec la leukotoxine de *Pasteurella haemolytica*.

Apx III n'est pas hémolytique mais fortement cytotoxique. Elle est aussi connue sous le nom de pleurotoxine. Elle est produite par les sérotypes 2, 3, 4, 6 et 8 du biotype 1 et a un poids moléculaire de 120 kDa.

Les gènes de structure et les gènes permettant la sécrétion de ces toxines ont été caractérisés (Frey, J. *et al.*, 1994b ; Jansen, R. *et al.*, 1994 ; Frey, J., 1995 a et b). Apx I est codé par l'opéron *apxI* qui contient quatre gènes : *apxIC* (un gène activateur), *apxIA* (le gène de structure codant la pré-toxine) et finalement, *apxIB* et *apxID*, les gènes permettant la sécrétion de la toxine. L'ordre des gènes est *apxICABD*. Les quatre gènes sont retrouvés au sein de la plupart des opérons. La protéine Apx IC est impliquée dans les modifications post-

traductionnelles activant la pré-toxine Apx IA. L'opéron entier est présent chez les sérotypes fortement hémolytiques 1, 5a, 5b, 9, 10 et 11 (qui expriment tous Apx I ; tableau 2.1). Chez les sérotypes 5a, 5b et 10, des variations de l'extrémité 3' du gène *apxI* entraînent la formation d'une toxine Apx I légèrement différente mais « immunologiquement » similaire. Apx II est codée par l'opéron *apxII* qui contient les gènes *apxIIC* et *apxIIA*. Les gènes permettant la sécrétion de la toxine sont toutefois absents. La toxine sera sécrétée grâce aux gènes *apxIBD* qui sont présents chez tous les sérotypes, à l'exception du sérotype 3. Apx III est, quant à elle, codée par l'opéron *apxIII* qui contient les mêmes gènes que l'opéron *apxI*. Les trois toxines sont produites sous une forme inactive (pré-toxine) qui sera activée (par acylation) par Apx C et d'autres protéines cellulaires. Les toxines sont par la suite sécrétées grâce aux protéines Apx B et Apx D qui sont associées à la membrane (Frey, J., 1995a).

TABLEAU 2.1

Génotypes pour les toxines Apx et phénotypes observés

pour les différents sérotypes

(Frey, J., 1995a)

Sérotypes	Toxines sécrétées	Gènes		
Biovar 1		Apx I	Apx II	Apx III
1, 5, 9, 11	Apx I + Apx II	C-A-B-D	C-A-B	
10	Apx I	C-A-B-D		
2, 4, 6, 8	Apx II + Apx III	B-D	C-A-B	C-A-B-D
3	Apx III		C-A-B	C-A-B-D
7, 12	Apx II	B-D	C-A-B	
Biovar 2		Apx I	Apx II	Apx III
2, 4, 7	Apx II	B-D	C-A-B	
9	Apx I + Apx II	C-A-B-D	C-A-B	

Il est maintenant clair que les toxines Apx jouent un rôle important dans la pathogénie de la pleuropneumonie porcine. Elles permettent à App de contourner les premières lignes de défense de l'hôte. À des concentrations élevées, les toxines RTX forment des pores dans les membranes des cellules phagocytaires et des autres cellules cibles de l'hôte et ces dernières deviennent plus sensibles aux variations de pression osmotique et meurent par lyse cellulaire (Lalonde, G. *et al.*, 1989). On sait aussi qu'elles sont responsables des lésions : elles sont toxiques pour les cellules endothéliales (Serebrin, S. *et al.*, 1991) et provoquent un « burst » respiratoire des macrophages et des neutrophiles (Dom, P. *et al.*, 1992a) résultant en la production de radicaux oxygène qui ont des effets létaux sur les cellules porcines. De plus, des toxines Apx recombinantes peuvent induire des lésions après instillation endobronchiale et des mutants ne produisant pas les toxines Apx n'induisent pas ces lésions (Kamp, E. M. *et al.*, 1993). Des expériences de mutagenèse par transposition (Tascon, R. I. *et al.*, 1994 et 1996) et par complémentation (Reimer, D. *et al.*, 1995) ont aussi prouvé que les toxines Apx sont essentielles pour qu'App puisse causer la pleuropneumonie porcine.

Dans une autre étude, les effets d'App et de ses métabolites sur la viabilité des cellules épithéliales des alvéoles porcines ont été déterminés en utilisant un test de consommation du rouge neutre (van de Kerkhof, A. *et al.*, 1996). Les cellules épithéliales alvéolaires de type II ont été isolées de porcelets âgés de cinq semaines privés de colostrum. L'incubation de ces cellules avec 10^6 ufc (unité formatrice de colonie) d'App biotype 1 sérotype 1 a résulté en la mort de ces cellules en une heure et demie. Les effets cytotoxiques ont aussi été observés quand les cellules épithéliales alvéolaires ont été incubées dans du surnageant stérile de culture d'App (biotype 1 sérotypes 1 et 10, biotype 2 sérotype 2) ou des cellules d'*E. coli* recombinantes produisant les toxines Apx I, Apx II ou Apx III. L'incubation des cellules épithéliales alvéolaires avec un mutant « knock-out » biotype 1 sérotype 1 incapable de

produire les toxines Apx I et Apx II n'a pas provoqué la mort de ces cellules. La cytotoxicité des surnageants a été neutralisée par l'ajout de sérum contenant des anticorps anti-Apx I et anti-Apx II. Cependant, ces sérums n'ont démontré aucune protection contre la mortalité cellulaire après exposition à App biotype 1 sérotype 1. Les résultats de ces études démontrent qu'App et ses métabolites sont capables de tuer les cellules de type II et que la toxicité est causée, en partie, par les toxines Apx. Les effets toxiques sur les cellules alvéolaires et la destruction des cellules endothéliales et des phagocytes sont responsables des lésions pulmonaires caractéristiques de la pleuropneumonie porcine à App. Il est remarquable que les sérums de lapin anti-Apx I et anti-Apx II ne soient pas capables de protéger les cellules de type II contre App biotype I sérotype I mais puissent neutraliser la toxicité d'un surnageant de culture. Une explication de ce phénomène a été trouvée au fil des études qui ont suivi. Il a été démontré qu'App adhère aux cellules alvéolaires *in vivo*. Récemment, il a aussi été démontré que ce phénomène a lieu *in vitro* (Haesebrouck, F. et al., 1996). Des cellules épithéliales alvéolaires ont été cultivées et fixées avec du méthanol. 10^8 ufc du biotype 1 (sérotypes 1-12) ont été ajoutées et les cultures cellulaires ont été incubées pendant 30 minutes à 37 °C. Après un lavage (4 fois dans de l'eau), les cellules ont été colorées avec les réactifs Hemacolor® (Merck) et observées à 1000 X. Les bactéries étaient intimement liées aux cellules alvéolaires épithéliales. Cette association pourrait faciliter l'accès des toxines Apx aux cellules alvéolaires épithéliales, induisant ainsi la destruction des cellules cibles même en présence d'anticorps neutralisants. Il a été démontré que les toxines produites par une bactérie adhésive sont plus facilement ciblées et deviennent relativement inaccessibles aux anticorps (Oftek, I. et al., 1990).

L'importance des toxines Apx dans l'immunité protectrice contre la pleuropneumonie porcine a été démontrée en immunisant des animaux avec des toxines Apx en combinaison avec

d'autres composantes bactériennes. Dans ces expériences, les toxines Apx se sont avérées essentielles pour conférer une protection après exposition (Byrd, W. et Kadis, S., 1992, van den Bosch, J. F. *et al.*, 1992 ; Beaudet, R. *et al.*, 1994 ; Jansen, R., 1994 ; Frey, J., 1995 a et b). Cependant, il est clair que les toxines Apx ne sont pas les seuls facteurs impliqués dans l'immunité protectrice.

2.2.7 Adhésines

Pendant une infection, les bactéries colonisent les muqueuses et adhèrent à leur surface. Les adhésines bactériennes se lient à des récepteurs spécifiques situés sur les cellules cibles. La reconnaissance et le processus d'attachement sont considérés comme les premières étapes permettant l'envahissement de l'organisme. L'hémagglutination (Jacques, M. *et al.*, 1988), tout comme l'adhésion *in vitro* d'App aux cellules épithéliales trachéales, à des sections pulmonaires congelées et au mucus respiratoire ont été décrites par Paradis *et al.*, en 1994. Dans ce processus d'adhésion, des lipopolysaccharides de haut poids moléculaire semblent impliqués.

2.3 Conclusion

La pathogénie d'App apparaît complexe : bien que plusieurs facteurs de virulence soient bien décrits, il est clair que d'autres composantes bactériennes pourraient jouer un rôle dans la pathogénie de la pleuropneumonie porcine (Haesebrouck, F. *et al.*, 1997). Les protéines qui sont exportées, soit à la surface d'App, soit dans le milieu externe, pourraient expliquer comment la bactérie envahit et interagit avec son hôte exclusif, le porc. Les protéines exportées sont plus susceptibles de stimuler une réponse immunitaire. Elles sont donc

candidates à la préparation d'un vaccin. Une meilleure connaissance des antigènes d'App est la clé de la mise au point d'un vaccin efficace.

CHAPITRE III

Identification de séquences d'ADN d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* codant pour des protéines exportées en utilisant le gène *phoA*.

3.1 Les antigènes et le criblage immunologique différentiel

Bien que les travaux de recherche des dernières années aient permis de démontrer l'existence de multiples facteurs de virulence (dont certains sont des antigènes) chez App, il est raisonnable de croire à l'existence de facteurs de virulence supplémentaires qui seraient exprimés spécifiquement *in vivo*. Ces facteurs (leurs gènes correspondants) étaient théoriquement impossibles à isoler car les techniques de la génétique moléculaire qui étaient couramment utilisées en laboratoire ne permettaient que la sélection et l'expression *in vitro*. L'hypothèse de l'existence de gènes s'exprimant seulement *in vivo* (dans l'organisme hôte) est intéressante et attrayante, notamment parce que plusieurs phénomènes observés au cours des infections en général, et de la pleuropneumonie porcine en particulier, demeurent inexplicables. À titre d'exemple, des travaux ont déjà fait état de la présence de pili chez App mais seulement chez des souches fraîches (un ou deux passages) et cultivées sur gélose au sang (Utrera, V. et Pijoan, C., 1991) ; des signaux chimiques *in vivo* obligatoires à l'expression de ce type de protéines pourraient être une explication pour ce phénomène transitoire. Toutefois, la caractérisation de pili chez App pourrait constituer une percée majeure au niveau de la pathogénie de la bactérie. Les facteurs de virulence présentement identifiés et caractérisés (notamment les cytolysines) n'expliquent pas complètement la variation de la virulence observée parmi les différents sérotypes d'App.

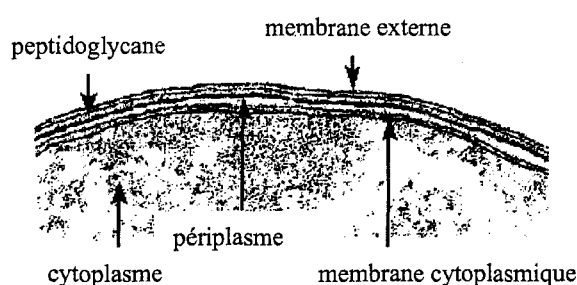
Il existe plusieurs méthodes qui permettent de rechercher des gènes exprimés *in vivo*. Parmi celles-ci, le criblage immunologique différentiel permet de mettre en évidence des antigènes. Le laboratoire de Dr Marc Sirois travaille à la mise au point de cette technique pour App sérotype 1. Le criblage immunologique différentiel permet de comparer des antigènes exprimés à partir d'une banque génomique d'expression et ainsi de sélectionner des gènes codant pour des protéines induisant une production d'anticorps. Cette technologie est puissante car elle permet la mise en évidence directe de gènes codant pour des antigènes, constituant ainsi une technologie prometteuse. Le criblage par anticorps de banques génomiques est une technique bien connue (Snyder, M. *et al.*, 1987). L'approche est basée sur la possibilité qu'un clone plasmidique ou phagique exprime la protéine codée par le gène cloné. Cette protéine est ensuite mise en évidence par des anticorps polyclonaux ou monoclonaux qui lui sont spécifiques. Plus récemment, cette méthodologie a été mise à profit afin de cloner des gènes codant pour des antigènes induits *in vivo* grâce au criblage différentiel d'une banque génomique de la bactérie *Borrelia burgdorferi* avec un sérum convalescent versus un sérum issu d'une immunisation avec des antigènes inactivés (Suk, K. *et al.*, 1995).

3.2 La technologie PhoA et les protéines exportées

Plusieurs génomes bactériens ont été entièrement séquencés dont ceux des espèces *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma genitalium* et *Staphylococcus aureus*. Le but de ces projets de génomique est d'identifier des gènes ou des protéines d'intérêt thérapeutique tels que des facteurs de virulence, des antigènes et de nouvelles cibles pour des antibiotiques. Une stratégie alternative permettant d'identifier des gènes d'intérêt thérapeutique est de cibler les

protéines à la surface bactérienne, les protéines extracellulaires et les protéines périsplasmiques. Les protéines d'intérêt thérapeutique sont souvent des protéines exportées (se trouvant à la surface bactérienne ou dans l'espace périsplasmique (figure 3.1)) ou sécrétées (dans l'environnement extracellulaire) car elles sont plus accessibles aux agents antimicrobiens de types inhibiteurs que les protéines contenues dans le cytoplasme.

FIGURE 3.1 La paroi des bactéries Gram négatives (microscopie électronique)



De plus, les protéines sécrétées ou associées aux membranes ont souvent un rôle à jouer dans le déroulement d'une infection et sont des cibles potentielles pour le développement de vaccins (Oliaro, J. *et al.*, 2000). Plusieurs facteurs de virulence sont exposés à la surface bactérienne : les adhésines permettant la liaison de la bactérie à la surface des cellules épithéliales de l'hôte en sont un bon exemple. De plus, les toxines et les autres protéines extracellulaires impliquées dans la pathogenèse sont transportées à travers la membrane cellulaire et la paroi pour être relâchées dans l'environnement externe (Adler, B. *et al.*, 1999).

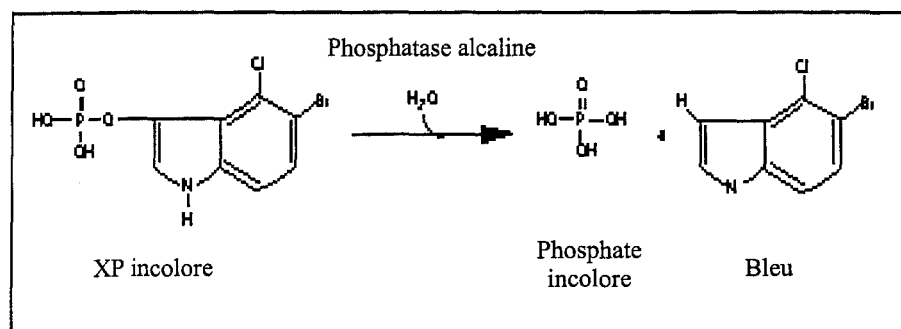
La technologie de fusions de gènes avec le gène de la phosphatase alcaline a été utilisée avec succès pour identifier plusieurs protéines exportées ou sécrétées chez plusieurs bactéries dont *Helicobacter pylori* (Bina, J. *et al.*, 1997), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Mintz, K. P. et Fives-Taylor, P. M., 1999), *Pasteurella multocida* (Adler, B. *et al.*, 1999),

Staphylococcus aureus (Williams, R. J. *et al.*, 2000), *Mycobacterium tuberculosis* (Lim, E. M. *et al.*, 1995), *Bacillus subtilis* (Payne, M. et Jackson, E., 1991), *Borrelia burgdorferi* (Giladi, M. *et al.*, 1993) et *Streptococcus agalactiae* (Hughes, M. *et al.*, 1999). Au laboratoire, nous avons utilisé le vecteur pHRM104 (Pearce, B. J. *et al.*, 1993) pour construire une banque génomique d'App sérotype 1 et isoler des gènes codant pour des protéines exportées ou sécrétées. L'approche présentée plus loin dans cet ouvrage peut se résumer de la façon suivante : le vecteur pHRM104, qui contient un gène de résistance à l'antibiotique érythromycine et le gène de la phosphatase alcaline sans promoteur ni séquence signal, '*phoA*', sera digéré par une endonucléase de restriction et l'ADN génomique d'App sérotype 1 préalablement digéré avec une endonucléase de restriction compatible sera introduit en amont du gène '*phoA*'. Après la ligation, la banque génomique sera insérée dans une souche d'*E. coli phoA*⁻ (mutant de délétion).

Il est à noter que la fusion transcriptionnelle dans un tel vecteur implique deux conditions : le fragment d'ADN inséré doit posséder un promoteur et une séquence signal. Les séquences insérées doivent être dans la bonne orientation par rapport à '*phoA*' et dans le bon cadre de lecture (open reading frame). Le promoteur est essentiel pour que la transcription du gène ait lieu. Après transcription et traduction, la protéine destinée à être exportée comporte une séquence signal. Cette courte séquence d'environ 15 à 25 acides aminés (extrémité N-terminale) permet l'exportation du polypeptide partiel codé par le fragment inséré et par la phosphatase alcaline. Après la traduction, cette séquence est retirée par une peptidase signal (Mintz, K. P. et Fives-Taylor, P. M., 1999). Le polypeptide en cours de synthèse sera transporté dans les différents compartiments cellulaires et pourra être acheminé vers sa destination finale. Cette dernière peut être le milieu extracellulaire, la surface bactérienne (paroi), la membrane interne ou l'espace périplasmique.

Le mécanisme de transport général du polypeptide comportant une séquence signal est le suivant : 1) la protéine sécrétée est dirigée grâce à la séquence signal et relâchée après excision de la séquence signal par la peptidase signal de type I ; 2) les protéines intégrées à une membrane sont modifiées et deviennent des lipoprotéines dont la partie lipidique sert à ancrer la macromolécule (Gomez, M. *et al.*, 2000). Puisque le gène '*phoA*' est contigu au gène inséré, la transcription et la traduction résultent en la création d'une protéine de fusion. La phosphatase alcaline d'*E. coli*, une phosphomonoestérase impliquée dans le métabolisme des polyphosphates (Nesmeyanova, M. A., 1999), n'est active qu'après son passage à travers le cytoplasme, via la création de ponts disulfures essentiels à son activité. On peut alors vérifier la présence de la protéine de fusion en ajoutant, au milieu de culture, un substrat colorimétrique de l'enzyme appelé XP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate). Les colonies bactériennes contenant une protéine de fusion exportée au-delà du cytoplasme pourront transformer le XP en un produit coloré bleu. Les colonies blanches contiennent une protéine de fusion non exportée (ou sécrétée). Les colonies qui n'ont pas incorporé le plasmide ne peuvent survivre en présence d'érythromycine puisqu'elles ne possèdent pas le gène de résistance à cet antibiotique (érythro^r). La sélection des clones se fait donc sur un milieu de culture contenant de l'érythromycine et du XP.

FIGURE 3.2 Transformation du XP (substrat de PhoA) en un produit coloré



3.3 Avantages de la technique

La fusion de gènes avec *phoA* permet l'identification rapide, relativement simple et peu coûteuse de protéines exportées ou sécrétées incluant potentiellement des gènes impliqués dans la virulence. Cette méthode peut être utilisée avec une variété de micro-organismes. Le choix de la cellule hôte est vaste : il suffit de choisir une souche d'*E. coli* qui est PhoA⁻. La technique peut être utilisée pour connaître la localisation de protéines connues ou mettre en évidence des protéines exportées qui sont inconnues.

3.4 Réalisations

En ce qui concerne *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Mintz, K. P. et Fives-Taylor, P. M., 1999), trente-deux clones ont été obtenus et les gènes complets de deux de ces clones ont été isolés à partir d'une banque phagique. Un gène a une homologie avec la lipoprotéine de la membrane externe du pathogène et l'autre a une homologie avec une protéine d'*Haemophilus influenzae*. Pour *Staphylococcus aureus* (Williams, R. J. *et al.*, 2000), quarante-deux clones à insert unique ont été obtenus. Treize d'entre eux ont une homologie avec des protéines connues de *S. aureus*. Douze autres clones ont une homologie avec des protéines non staphylococciques. Les dix-sept clones restants ont des séquences uniques inconnues. Pour *Helicobacter pylori* (Oliaro, J. *et al.*, 2000), un antigène de 18 kDa a été mis en évidence par la fusion PhoA. Des immunobuvardages démontrent que cette protéine est reconnue par des anticorps chez 71 % des patients infectés et chez 16 % des patients sains. Cet antigène est donc exprimé *in vivo* et semble impliqué dans la pathogenèse. En 1997, vingt-cinq clones ont été ciblés par Bina *et al.* en utilisant la fusion PhoA. Pour *Pasteurella multocida* (Adler, B. *et*

al., 1999), en utilisant l'approche PhoA, l'équipe d'Adler a cloné le gène codant une protéine de la membrane externe similaire à OmpH, une porine de *P. multocida* sérotype A : 1. En ce qui concerne *Streptococcus agalactiae* (Hughes, M. *et al.*, 1999), une nouvelle protéine localisée à la surface de cette bactérie a été mise en évidence en utilisant la fusion PhoA. Cette dernière s'est avérée antigénique et est présente à la surface de plusieurs sérotypes de *S. agalactiae*. Sa fonction n'est pas encore connue.

3.5 Utilisation du vecteur pHRM104 : étude d'App sérotype 1

Le chapitre qui suit décrit en détail le matériel et les méthodes utilisés, les résultats obtenus ainsi que leur analyse.

CHAPITRE IV

MATÉRIEL ET MÉTHODES

4.1 Construction de la banque génomique d'App 4074 (ATCC 27088) dans le vecteur pHRM104

La première étape de la technologie de fusion avec la phosphatase alcaline est la création de la banque génomique. Pour ce faire, plusieurs digestions enzymatiques ont été faites dans le but d'établir les conditions optimales. Il est à noter que toutes les enzymes utilisées proviennent de Roche Diagnostics sauf lorsqu'indiqué autrement. Le vecteur pHRM104 (5 μ L d'une préparation Midiprep de Qiagen) a été digéré avec dix unités d'enzyme Bam HI en présence de tampon B et d'eau stérile, pendant 90 minutes à 37 °C. La réaction a été arrêtée par la chaleur (65 °C, 15 minutes). Pour éviter que le vecteur ne se referme sur lui-même, une déphosphorylation a été effectuée avec une phosphatase alcaline de crevette dans le tampon approprié pendant dix minutes à 37 °C. L'enzyme a par la suite été inactivée pendant 15 minutes à 65 °C. Pour la préparation de l'ADN génomique, la souche d'App 4074 a été cultivée en agitation pendant 16 heures à 37 °C dans du bouillon Tryptic Soy Broth (Difco) avec un supplément d'Isovitalex 1 % (BBL). L'extraction et la purification de l'ADN ont été faites selon la méthode phénol-chloroforme. La digestion a été effectuée avec l'enzyme Sau 3AI de New England Biolab (4 unités), en présence du tampon approprié pendant 1 h à 37 °C. Cette enzyme génère des extrémités compatibles avec celles générées par Bam HI.

TABLEAU 4.1
Digestions enzymatiques

Vecteur	ADN génomique
5 µL pHRM 104 (1 µg d'ADN)	10 µL ADN App 4074 dilué 1 : 2 (2 µg d'ADN)
1 µL Bam HI 10 U/µL	1 µL Sau 3A1 4 U/µL
2 µL tampon B 10 x	2,5 µL tampon pour Sau 3A1
12 µL eau stérile ¹	2,5 µL albumine bovine sérique 10 x
	9 µL eau stérile

Les deux digestions ont été déposées sur un gel d'agarose 1 % en tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) qui a été soumis à une électrophorèse (85 V, 60 minutes) et coloré au bromure d'éthidium de la façon habituelle. En ce qui concerne l'ADN génomique, les fragments de 0,5 à 1,5 kpb (kilopaires de bases) ont été découpés sur le gel et purifiés avec la trousse Qiaquick gel extraction (Qiagen). La bande correspondant au vecteur (selon la taille obtenue) a aussi été découpée et purifiée avec la même trousse.

La ligation de pHRM104 digéré avec l'enzyme Bam HI avec les inserts Sau 3AI d'App 4074 (0,5-1,5 kpb) a été effectuée pendant 12 heures à 16 °C. Les fragments d'ADN, l'ADN ligase (1 unité) et le vecteur pHRM104 digéré et purifié ont été mélangés dans le tampon approprié de la compagnie et de l'eau stérile. Le lendemain, la ligation a été désalée par osmose sur une colonne d'agarose (1 %) / glucose pendant 90 minutes à 0 °C.

¹ Pour toutes les manipulations, l'eau utilisée est toujours stérile, déminéralisée et distillée.

TABLEAU 4.2

Ligation pHRM 104 / inserts d'App 4074

Ligation
5 μ L pHRM 104 digéré et purifié
10 μ L inserts App 4074 purifiés
1 μ L ADN ligase 1 U / μ L
2 μ L tampon ADN ligase 10 X
2 μ L eau stérile

Les cellules de *E. coli* CC118 et de *E. coli* DH5 α ont été préparées pour l'électroporation. Une culture de chacune des souches a été préparée dans 4 mL de Tryptic Soy Broth (TSB) et incubée à 37 °C pendant 12 heures. 36 mL de TSB ont été ajoutés à chacune des cultures et les flacons ont été incubés à 37 °C en agitation pendant 90 minutes. Les cultures ont été ensuite centrifugées (4 °C, 5 000 rpm, 10 minutes). Les étapes suivantes ont été répétées deux fois : décantation, ajout de 40 mL d'eau stérile et centrifugation (4 °C, 5 000 rpm, 10 minutes). Les cellules ont été resuspendues dans le volume d'eau résiduel. Les cellules ont été conservées sur la glace jusqu'à l'électroporation. L'électroporation a été effectuée dans des cuvettes Bio-Rad d'un millimètre dans lesquelles 40 μ L de cellules ont été déposées. Plusieurs essais ont été effectués avec deux souches différentes d'*E. coli* (tableau 4.3).

TABLEAU 4.3

Essais d'électroporation

Cellules utilisées (<i>E. coli</i>)	μL de ligation
DH5 α	1
DH5 α	5
CC118	1
CC118	5

Tous les essais ont été faits à 1,8 kV et les contrôles (cellules sans ADN-vecteur) ont donné les résultats attendus (pas de croissance sur le milieu LB avec érythromycine, croissance sur milieu LB). Les quatre tubes ont été incubés dans 1 mL de milieu LB Miller durant une heure, à 37 °C. Une aliquote de 100 μL pour chacun des essais a été étalée à la surface d'une gélose LB contenant de l'érythromycine (250 $\mu\text{g/mL}$) et du XP (50 $\mu\text{g/mL}$). Les gélases ont été incubées à 37 °C durant 24 heures.

4.2 Résultats

Après 36 heures d'incubation, une seule colonie bleu foncé (désignée clone # 1 / CC118) a été observée sur les gélases. Il y avait plusieurs colonies blanches et des colonies satellites (résultant d'une diminution de la concentration de l'érythromycine autour des colonies blanches). Une culture d'une colonie blanche et une culture de la colonie bleue ont été effectuées dans le but de vérifier la présence de plasmides par une trousse de mini-préparations plasmidiques (Qiagen). Chacune des cultures contenait un plasmide.

4.3 Cheminement

Toujours en utilisant la même ligation, l'électroporation a été refaite dans les mêmes conditions et les cultures ont été étalées à la surface d'une gélose LB contenant 500 µg/mL d'érythromycine et 50 µg/mL de XP. Après une incubation de 36 heures à 37 °C, deux colonies bleu foncé (DH5α) ont été observées et il n'y avait aucune colonie satellite. Les colonies bleues (désignées clones # 2 et # 3) ont été repiquées (méthode par épuisement) sur le même milieu. Les clones ont été vérifiés par miniprep : ils contenaient tous un plasmide. En raison des résultats qui apparaissaient plus prometteurs, la souche DH5α a été choisie pour le reste de l'expérience.

En utilisant la même ligation, l'électroporation a été refaite dans *E. coli* DH5α et quatre géloses LB contenant de l'érythromycine (500 µg/mL) et du XP (50 µg/mL) ont été ensemencées avec 250 µL de culture. Après une incubation de 36 heures à 37 °C, 8281 colonies ont été comptées. 94 des 8281 colonies étaient bleues (fusions avec *phoA*) et 12 des 94 colonies ont un halo bleu (voir discussion). Les 94 colonies ont été isolées à la surface de géloses LB contenant de l'érythromycine et du XP.

TABLEAU 4.4

Résumé des résultats obtenus après la troisième électroporation

Nombre total des colonies	8281
Nombre de colonies bleues (%)	94 (1,135 %)
Nombre de colonies avec un halo bleu (%)	12 (0,145 %)

4.4 Sélection des clones

Afin de ne séquencer que les clones les plus intéressants, c'est-à-dire codant des protéines réagissant avec des sérums de porcs infectés par App, il était essentiel de mettre en évidence l'antigénicité de ces derniers. Pour cela, des gels de protéines des clones et des immunobuvardages de type Western ont été réalisés.

4.5 Préparation des clones pour les gels de polyacrylamide (SDS-PAGE, système d'électrophorèse Mini-PROTEAN II Cell de Bio-rad)

Le système dénaturant discontinu de Laemmli est le plus utilisé pour séparer des protéines. Ces dernières sont dénaturées par la chaleur en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS) et d'un agent réducteur tel le 2-mercaptoéthanol (ME). Les polypeptides résultants ont alors un ratio charge-masse uniforme et migrent de façon semblable dans le treillis formé par les longues chaînes de polyacrylamide et de bis-acrylamide. La polymérisation est activée par la présence de TEMED et de persulfate d'ammonium. Les protéines vont migrer selon leur poids moléculaire (kilodaltons). Le gel de compression (4 %) permet d'aligner les échantillons grâce au treillis large. Le gel séparateur (10 %) permet de séparer les protéines selon leurs poids moléculaires respectifs.

Des cultures bactériennes ont été préparées en inoculant, pour chacun des clones de fusion, une colonie dans 5 mL de TSB avec 500 µg/mL d'érythromycine. Les cultures ont été incubées à 37 °C (16 heures, avec agitation). Par la suite, les cultures ont été centrifugées (5 000 rpm, 10 minutes) et les culots ont été resuspendus avec 350 µL de tampon de dépôt (solution contenant 0,25 mL de ME, 0,125 mL de bleu de bromophénol 0,1 %, 2 mL de SDS 10 % et 2,65 mL de solution 0,5 M Tris HCl pH 8,8). Les culots ont été mis à bouillir pendant

5 minutes et ont été centrifugés dans une microcentrifugeuse à 13 000 rpm pendant 5 minutes.

10 μ L de surnageant ont été déposés dans les puits du gel.

Les gels ont été préparés de la façon habituelle (tableaux 4.5 et 4.6).

TABLEAU 4.5

Préparation du gel séparateur 10 %

Solution	mL
H ₂ O	2.0
30% Acrylamide	1.7
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3
10% SDS	0.05
10% APS	0.05
TEMED	0.002

TABLEAU 4.6

Préparation du gel de compression 4 %

Solution	mL
H ₂ O	2.2
30% Acrylamide	0.4
1.0 M Tris (pH 6.8)	0.38
10% SDS	0.03
10% APS	0.03
TEMED	0.003

La migration a été effectuée de la façon habituelle (75 V, 45 minutes ; 120 V, 60 minutes). Le gel a été coloré avec le bleu de coomassie et décoloré avec la solution décolorante.

4.5.1 Préparation des solutions pour l'électrophorèse SDS-PAGE :

- 30% Acrylamide : 30 g acrylamide, 0.8 g bis-acrylamide, eau distillée jusqu'à 100 mL.
- APS (ammonium persulfate) 10% : 0.04 g dans 0.4 mL d'eau distillée. A préparer fraîchement. Conserver à l'obscurité et à - 20 °C.
- 1.5 M Tris pH 8.8 : 18.15 g de Tris base dans 80 mL d'eau distillée. Ajuster le pH avec du HCl concentré et ajuster le volume à 100 mL. Autoclaver.
- 1 M tris pH 6.8 : 12.1 g de Tris base dans 80 mL d'eau distillée. Ajuster le pH avec du HCl concentré et ajuster le volume à 100 mL. Autoclaver.
- SDS (sodium dodecyl sulfate) 10% : 10 g de SDS dans 100 mL d'eau distillée.
- Tampon de cuve Laemmli 10X : 800 mL d'eau distillée, 30.3 g de Tris base, 144.2 g de glycine et 10 g de SDS. Ajuster le pH à 8.3 et compléter le volume à 1 L. Utiliser une dilution 1 : 10 pour l'électrophorèse. Conserver à 4 °C.
- Colorant (bleu de Coomassie) : 125 mL d'isopropanol, 50 mL d'acide acétique glacial, 325 mL d'eau distillée et 1.25 g de bleu brillant Coomassie (R250)
- Solution décolorante : 50 mL de méthanol, 70 mL d'acide acétique glacial, eau distillée jusqu'à 1 L.

4.5.2 Transfert du gel sur membrane de nitrocellulose (Trans-Blot SD Semi-dry transfer de Bio-rad)

L'appareil « **Trans-blot semi-dry Electrophoretic transfer cell** » (**Bio-Rad**) peut être utilisé pour transférer de l'ADN, de l'ARN ou des protéines d'un gel d'agarose ou de polyacrylamide sur des membranes de nitrocellulose ou PVDF. Le transfert est effectué à l'aide d'électrodes plates en position horizontale. Le gel et la membrane de nitrocellulose « sont pris en sandwich » entre des papiers filtres imbibés d'un tampon qui sert de réservoir ionique. Les électrodes, séparées seulement par les filtres de papier, fournissent un champ électrique très puissant (V/cm) permettant un transfert très efficace et rapide.

4.5.3 Protocole pour le transfert de protéines (SDS-PAGE)

Le tampon de transfert de Bjerrum et Schafer-Nielsen a été préparé en dissolvant 5.82 g de Tris et 2.93 g de glycine dans un volume final de 1 L d'eau distillée. Le tampon a été conservé à 4 °C jusqu'à son utilisation. Le gel de polyacrylamide a été équilibré dans 500 mL de tampon pendant 15 minutes. La membrane et les papiers filtres découpés aux dimensions du gel ont été mouillés dans le tampon délicatement puisque l'immersion abrupte peut provoquer l'emprisonnement de bulles d'air dans la matrice de la membrane et empêcher le transfert. Le « sandwich » a été déposé sur l'anode dans l'ordre suivant (en prenant soin d'enlever les bulles en roulant avec une pipette Pasteur) : papier filtre (2 épaisseurs), membrane, gel, papier filtre (2 épaisseurs). Le transfert a été effectué selon les directives du manufacturier (15 V, 15 minutes).

4.5.4 Immunobuvardage de type Western

Préparation de solutions (réf. : Protoblot Immunoscreening System, Promega Biotech, technical manual)

- Tris Buffered Saline + Tween 20 (TBST) : 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20 ; pour 1 L de 10 x, mélanger 100 mL de Tris 1 M, 300 mL de NaCl 5 M, 5 mL de Tween 20. Utiliser 1 x pour le criblage.
- Tris-HCl pH 9.5 : 12.14 g de Tris base pour 100 mL de solution, ajuster le pH à 9.5 avec du HCl 5 N.
- Solution de blocage : 5 g de lait écrémé en poudre « Carnation » dans du TBST 1 x. Compléter à 100 mL.
- Solution Stop ou « Reaction stop/storage buffer » : 20 mM Tris-HCl pH 8.0 (20 mL de Tris-HCl 1 M pH 8.0), 5 mM EDTA (10 mL d'EDTA 50 mM), compléter à 100 mL.

4.5.5 Test préliminaire des anticorps (par dot-blot)

L'immunobuvardage de type Western dépend de la qualité de l'anticorps primaire utilisé. Celui-ci doit être apte à détecter la protéine d'intérêt. Il est important de déterminer le titre de cet anticorps avant de commencer le criblage de « Western blot » pour les raisons suivantes :

- 1- Pour confirmer la capacité de l'anticorps primaire de détecter au minimum quelques nanogrammes d'antigènes.
- 2- Pour déterminer la concentration appropriée de l'anticorps primaire (la plus grande dilution qui donne une réaction fortement positive).
- 3- Pour déterminer si l'anticorps primaire réagira avec l'antigène après le transfert sur membrane de nitrocellulose.

- 4- Pour déterminer si l'anticorps primaire réagit avec les protéines d'*E. coli*, augmentant le bruit de fond et générant de faux positifs. Si ce phénomène a lieu, les anticorps à réaction croisée doivent être pré-adsorbés des anticorps primaires en les mettant en contact avec un lysat protéique d'*E. coli*.

4.5.6 Dot-blot pour les sérums porcins

Pour vérifier les points 1 à 4 ci-dessus mentionnés, nous avons procédé à un essai de type « dot-blot ».

Nous avons utilisé six membranes de nitrocellulose (2 par 3 cm) pour effectuer le dot-blot test. Chaque bandelette a été divisée en trois parties : Ag (antigènes), Ac (anticorps) et Ec (*E. coli*). Six dilutions différentes de l'antigène (App 4074 lysé avec SDS 1%) ont été déposées (1 µL) sur les bandelettes en ordre décroissant de concentration (ligne Ag). Ces dilutions d'Ag (non dilué, 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10 000, 1 : 100 000) nous ont permis de déterminer la dilution d'anticorps primaire la plus adéquate pour le criblage. L'anticorps primaire (sérum de porc convalescent (goutte de gauche) et serum de porc immunisé par vaccination (goutte de droite)) a aussi été dilué et 1 µL de chacune des six dilutions (1 : 100, 1 : 200, 1 : 400, 1 : 600, 1 : 800 et 1 : 1 000) différentes a été déposée (1 µL) sur les bandelettes en ordre décroissant de concentration (ligne Ac). Quatre dilutions en série d'un lysat d'*E. coli* (non dilué, 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1 000) ont été déposées (1 µL) dans le même ordre sur les membranes (ligne Ec). Les membranes ont été séchées cinq minutes à l'air et immergées dans une solution de lait écrémé en poudre (5 % ; dans du TBST 1 x) pendant une heure à la température de la pièce. Les membranes ont ensuite été lavées trois fois dans du TBST 1 x. Six dilutions de l'anticorps

primaire (porc convalescent 1 : 100, 1 : 200, 1 : 400, 1 : 600, 1 : 800, 1 : 1 000) ont été préparées dans du TBST 1 x et les six membranes y ont été placées pendant une heure. Trois lavages dans du TBST 1 x ont été effectués et les membranes ont été placées dans la dilution adéquate d'anticorps secondaires (anti-IgG de porc couplés à la phosphatase alcaline) Sigma (1 : 30 000) pendant une heure. Trois autres lavages ont été faits dans du TBST 1 x. Le substrat de la phosphatase alcaline (NBT-BCIP) a été ajouté et la réaction a été développée jusqu'à l'intensité désirée. La réaction a été arrêtée par l'ajout de la solution « Stop ».

4.5.7 Analyse des résultats

La première ligne (Ag) nous permet de déterminer la dilution adéquate d'anticorps primaire à utiliser. La plus grande dilution de cet anticorps donnant un signal raisonnable est 1 : 2000. La seconde ligne (Ac) nous permet de vérifier l'affinité de l'anticorps secondaire pour l'anticorps primaire. Les résultats obtenus sont satisfaisants. Quant à la troisième ligne (Ec), elle nous indique que des anticorps contaminants sont présents dans le sérum de porc convalescent et que ceux-ci ont une réaction croisée avec les antigènes d'*E. coli*.

4.5.8 Discussion

Même s'ils ne sont pas discutés dans le présent mémoire, plusieurs autres essais avec des sérums porcins (porc convalescent et porc immunisé) ont été tentés. La dilution optimale déterminée pour le sérum de porc convalescent est 1 : 2 500. Nous avons donc utilisé cette dilution pour faire les essais d'immunobuvardage.

4.5.9 Réaction Ag-Ac

Après avoir transféré le gel de polyacrylamide sur membrane de nitrocellulose (Amersham) par la méthode de transfert semi-sec (Trans-blot SD Semi-dry transfer cell de Bio-Rad, tampon de Bjerrum et Schafer-Nielsen) selon les directives du manufacturier, la membrane a été bloquée pendant 12 heures dans une solution de lait écrémé en poudre (5% ; dans du TBST 1 x) afin de lier les sites non spécifiques. La membrane a été rincée brièvement dans du TBST 1 x et incubée 30 minutes à température ambiante dans une dilution 1 : 2 500 (TBST 1 x) de sérum de porc convalescent (fourni par Dr Marcelo Gottschalk, Faculté de médecine vétérinaire de St-Hyacinthe, souche 4074). Trois lavages ont été effectués dans du TBST 1 x et les membranes ont été incubées pendant 30 minutes dans une dilution 1 : 30 000 (TBST 1 x) d'anticorps secondaires anti-porc conjugués à la phosphatase alcaline de la compagnie Sigma. Trois autres lavages (TBST 1 x) ont suivi et les membranes ont été développées avec le substrat de la phosphatase alcaline (NBT (nitro blue tetrazolium) - BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)) prêt à être utilisé (Sigma). La réaction colorimétrique a été arrêtée par l'ajout de la solution « Reaction stop/storage buffer » (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA).

4.5.10 Résultats

Après avoir criblé les 94 clones, 41 clones se sont avérés positifs, c'est-à-dire séro-réacteurs. Quarante-trois % des colonies bleues ont réagi avec le sérum porcin. La réaction envers *E. coli* a aussi été testée (bruit de fond) et toutes les réactions y ont été comparées. Seuls les clones fortement positifs ont été sélectionnés. Le tableau 4.7 résume les résultats obtenus pour chacun des clones.

TABLEAU 4.7

Résultats obtenus après le « Western blot » et décision quant au séquençage pour les 94 clones

Clone	Halo ?	Séro-réacteur ?	A séquençer ?	Clone	Halo ?	Séro-réacteur ?	A séquençer ?
1-1	*	Oui	Oui	1-34	Oui		Oui
1-2		Oui	Oui	1-37			
1-3		Oui	Oui	1-38	Oui	Oui	Oui
1-4		Oui	Oui	2-5a		Oui	Oui
1-7	Oui	Oui	Oui	2-6			
1-8	Oui	Oui	Oui	2-8			
1-10			Oui	2-9b			
1-12		Oui	Oui	2-16			
1-17			Oui	2-19			
1-18	Oui	Oui	Oui	3-1		Oui	Oui
1-25			Oui	3-2		Oui	Oui
2-1		Oui	Oui	3-4	Oui		Oui
2-2		Oui	Oui	3-6			Oui
2-4		Oui	Oui	3-7			
3-3	Oui	Oui	Oui	3-9a			Oui
3-5			Oui	3-9b			Oui
3-8a			Oui	3-10		Oui	Oui
3-8b	Oui	Oui	Oui	3-11	Oui		Oui
3-14		Oui	Oui	3-12			
3-16		Oui	Oui	3-17			Oui
3-19	Oui		Oui	3-23		Oui	Oui
3-20			Oui	3-24			Oui
4-2		Oui	Oui	3-25			
4-3			Oui	3-26			
4-4		Oui	Oui	3-28			
4-6			Oui	3-34			
4-7		Oui	Oui	3-36			
4-8	Oui	Oui	Oui	3-37			
4-9			Oui	3-39			
4-10			Oui	4-1			
4-17		Oui	Oui	4-5		Oui	Oui
4-27		Oui	Oui	4-11		Oui	Oui
1-5		Oui	Oui	4-12		Oui	Oui
1-6				4-13a		Oui	Oui
1-9				4-13b			
1-11		Oui	Oui	4-14		Oui	Oui
1-14				4-15			
1-15		Oui	Oui	4-16		Oui	Oui
1-16				4-18			
1-19		Oui	Oui	4-19			
1-22				4-21			
1-23			Oui	4-23			
1-24		Oui	Oui	4-24			
1-26		Oui	Oui	4-28			
1-27		Oui	Oui	4-29			
1-28				4-30			
1-33	Oui	Oui	Oui	1-37			

* Le blanc correspond à « non » pour plus de clarté. Le gras est utilisé pour mettre en évidence les clones avec halo. Le souligné est utilisé pour mettre en évidence les clones non séro-réacteurs qui seront séquencés.

Les 41 clones séro-réacteurs ont tous été séquencés (tableau 4.8). 20 des 53 clones non séro-réacteurs ont été séquencés (tableau 4.9). Au total, 61 clones ont été séquencés. L'oligonucléotide 5'-CACCCGTAAACGGCGAGCA-3' a été utilisé pour le séquençage. Il

est localisé à 100 bases du site BamHI, dans le gène '*phoA* du plasmide pHRM 104. Les réactions de séquençage ont été obtenues grâce au séquenceur ABI Prism Terminator Cycle sequencing (Applied Biosystem) du service de séquençage de l'Université Laval. L'analyse des séquences a été effectuée grâce au logiciel GCG (version 10.2, Genetics Computer Group). En comparant les séquences obtenues avec des séquences de gènes déjà connues (homologie), il sera possible de déterminer si les gènes isolés correspondent à des gènes déjà connus chez App ou chez d'autres bactéries. Les séquences d'ADN obtenues après séquençage seront converties en séquences d'acides aminés. Les comparaisons de séquences seront effectuées à partir de ces séquences d'acides aminés : le code génétique (correspondance codon d'ARN / acide aminé) variant quelque peu selon les micro-organismes. Le pourcentage d'homologie permettra alors de déterminer si le gène est nouveau ou s'il est déjà connu.

TABLEAU 4.8

Description après séquençage des 41 clones séro-réacteurs

#	Clone*	Halo ?	% identité **	Homologie
1	1-1		52,3	Organic solvent tolerance protein, <i>H. influenzae</i>
2	1-2		82,2	Lipoprotein gene, <i>P. haemolytica</i>
3	1-3		73	D-ribose ABC transporter, permease protein, <i>H. influenzae</i>
4	1-4		56,7	Rod-shape determining protein (mreD), <i>H. influenzae</i>
5	1-5		64,7	FaZ, <i>H. influenzae</i>
6	1-7	Oui	30,4	Haemolysin bactericin (traC) gene, <i>E. faecalis</i>
7	1-8	Oui	-----	Étrange séquence répétée
8	1-11		48,3	Formyltetrahydrofolate synthetase (FTHFS), <i>Clostridium thermoaceticum</i>
9	1-12		92,9	ApaD, App
10	1-15		75	Malate dehydrogenase (mdh), <i>H. influenzae</i>
11	1-18	Oui	41,3	Stationary phase survival protein (SurA), <i>H. influenzae</i>
12	1-19		78,1	Malate dehydrogenase (mdh), <i>H. influenzae</i>
13	1-24		55,8	Hypothetical protein, <i>Methanococcus jannaschii</i>
14	1-26		48,3	Idem 1-11
15	1-27		48,4	Outer membrane antigen gene (oma87), <i>P. multocida</i>
16	1-33	Oui	46,2	Molybdate transport operon (Mod), <i>E. coli</i>
17	1-38	Oui	-----	Aucune correspondance
18	2-1		26,5	Endopeptidase O, <i>P. gingivalis</i>
19	2-2		28,2	Protéine inconnue, <i>E. coli</i>
20	2-4		-----	Impossible de trouver un signal d'exportation
21	2-5a		56,7	Conserved hypothetical protein, <i>H. influenzae</i>
22	3-1		70,6	Lipoprotein, <i>P. haemolytica</i>
23	3-2		60	Orf-2 non caractérisé, <i>E. coli</i>
24	3-3	Oui	52,4	IPA28D, <i>Bacillus subtilis</i>
25	3-8b	Oui	-----	Rien
26	3-10		37,7	Orf-2 non caractérisé, <i>Zymomonas mobilis</i>
27	3-14		100	CblL (putative cytoplasmic protein), App
28	3-16		45,1	Signal peptidase lepB, <i>H. influenzae</i>
29	3-23		100	Hypothetical protein, App
30	4-2		84,1	Protéine inconnue attachée à la membrane interne, <i>H. influenzae</i>
31	4-4		69,6	NapC, <i>H. influenzae</i>
32	4-5		62,5	TRK systeme potassium uptake, <i>H. influenzae</i>
33	4-7		73,3	NADH ubiquinone oxidoreductase, <i>H. influenzae</i>
34	4-8	Oui	60,2	LolA, <i>H. influenzae</i>
35	4-11		?	Idem 1-8
36	4-12		50	NrfF, <i>H. influenzae</i>
37	4-13a		64,4	UDP sugar hydrolase, <i>E. coli</i>
38	4-14		84,1	Hypothetical protein, <i>H. influenzae</i>
39	4-16		65,7	MitC, <i>H. influenzae</i>
40	4-17		27,8	MalA gene, <i>C. perfringens</i>
41	4-27		64,4	UDP sugar hydrolase, <i>E. coli</i>

*La longueur moyenne des inserts est de 585 pb. **Le pourcentage d'identité réfère au nombre d'acides aminés présentant une similitude lors de l'alignement des séquences d'acides aminés.

En consultant les tableaux 4.7 et 4.8, nous pouvons constater que 8 des 12 clones avec un halo sont séro-réacteurs. Puisque les clones 1-33 et 1-34 sont identiques, il s'agit plutôt de 8 clones sur 11. 72,73 % des clones avec un halo sont donc séro-réacteurs.

TABLEAU 4.9

Description après séquençage des 20 clones non séro-réacteurs

#	Clone *	Halo	% identité **	Homologie
1	1-10		51,3	Conserved hypothetical protein, <i>H. influenzae</i>
2	1-17		83,6	Conserved hypothetical integral membrane protein, <i>H. influenzae</i>
3	1-25		28,7	FhuD, <i>E. coli</i>
4	3-5		59,7	Heme binding lipoprotein, <i>H. influenzae</i>
5	3-8a		?	?
6	3-19	Oui	-----	Idem 1-3
7	3-20		79,8	Protéine inconnue, <i>H. influenzae</i>
8	4-3		30,9	Protéine inconnue, <i>E. coli</i>
9	4-6		52,6	Possible heme lyase subunit, <i>E. coli</i>
10	4-9		-----	Idem 1-1
11	4-10		62,5	TRK system potassium uptake protein, <i>H. influenzae</i>
12	1-23			Idem 1-2
13	3-24		-----	Idem 1-1
14	3-11	Oui	-----	Idem 4-8
15	3-17		29,2	OspD, <i>B. garrinii</i>
16	3-9a		-----	Idem 4-8
17	3-9b		-----	Idem 3-23
18	3-6		-----	Idem 3-4
19	3-4	Oui	26,4	Penicillin binding protein 1A, <i>S. pneumoniae</i>
20	1-34	Oui	-----	Idem 1-33

*La longueur moyenne des inserts est de 585 pb. ** Le pourcentage d'identité réfère au nombre d'acides aminés présentant une similitude lors de l'alignement des séquences d'acides aminés.

Le tableau 4.10 présente un résumé des résultats obtenus.

TABLEAU 4.10

Résumé des résultats obtenus

8281 colonies ...
94 colonies bleues (1,135 %) → 94 fusions avec <i>phoA</i>
12 colonies avec un halo bleu sur 94 colonies (12,77 %) → contiennent une protéine exportée hors du cytoplasme
41 clones sur 94 sont séro-réacteurs (43,62 %) → réagissent avec le sérum de porc convalescent
61 clones (41 séro-réacteurs + 20 autres clones) ont été séquencés

DISCUSSION

Les travaux décrits dans le présent mémoire découlent de la nécessité d'élaborer un nouveau vaccin plus efficace pour prévenir la pleuropneumonie porcine. Puisque le génome d'App n'est pas entièrement connu, certains antigènes demeurent toujours inconnus. La plupart de ceux-ci sont des protéines situées à la surface bactérienne ou sont sécrétées hors du cytoplasme grâce à la séquence signal (leader peptide), qui consiste en une séquence de 15-25 acides aminés généralement hydrophobes. La phosphatase alcaline, rappelons-le, n'est active qu'après son transport au-delà du cytoplasme (Giladi, M. *et al.*, 1993; Lim, E. M. *et al.*, 1995). La protéine de fusion générée par la technologie PhoA doit être exprimée et transportée au-delà du cytoplasme pour être détectée (colonie bleue).

En ce qui concerne les limites de la technique, il y a plusieurs points à mentionner à ce sujet (Williams, R. J. *et al.*, 2000 ; Bina, J. E. *et al.*, 1997). a) Seules les protéines exprimées (insertion du gène dans le bon sens 5' vers 3', création du cadre de lecture approprié et reconnaissance du promoteur d'App par l'ARN polymérase d'*E. coli*) et transportées (reconnaissance d'une séquence signal hétérologue) sont détectées ; b) l'identification d'un gène dépend des séquences retrouvées dans les banques de données et du degré de conservation des acides aminés : les nouveaux gènes (séquences jamais décrites auparavant) ne peuvent donc pas être caractérisés ; c) les protéines faiblement exprimées peuvent être difficiles à détecter ; d) la fusion de PhoA avec des acides aminés hydrophobes présents au niveau des protéines cytoplasmiques peut donner une activité enzymatique (bruit de fond) ; e) de plus, certains gènes ne s'expriment que lorsque certaines conditions environnementales sont réunies : le milieu nutritif utilisé n'équivaut pas à l'hôte habituel, le porc.

De plus, plusieurs possibilités peuvent se présenter quant à la fusion : a) une fusion de PhoA avec une protéine sans peptide leader (protéine *cytoplasmique*) ne donnera pas une protéine de fusion, donc la colonie sera blanche ; b) les protéines ancrées à la *membrane interne* ont un peptide leader non clivé (Gomez, M. *et al.*, 2000) ce qui donne une fusion PhoA localisée et une colonie bleue ; c) les protéines *sécrétées* ont un peptide leader clivé (Gomez, M. *et al.*, 2000), la fusion est extracellulaire et donne une colonie bleue ; d) les protéines de la *membrane externe* ont, elles aussi, un peptide leader clivé (Worley, M. et Herffron, F., 2000). La fusion est à la surface bactérienne et donne une colonie bleue ; e) les protéines *périplasmiques* ont aussi un peptide leader clivé (Worley, M. et Heffron, F., 2000), donnent des fusions périplasmiques et la colonie est bleue. Il faut toutefois mentionner que certaines souches d'*E. coli* sont plus perméables (Adler, B. *et al.*, 1999) et que, dans ces cas, les fusions *périplasmiques* donnent un *halo bleu* (le produit issu de la réaction enzymatique peut diffuser dans la gélose). Il semble donc y avoir deux situations possibles pour les protéines *périplasmiques* : certaines souches (*E. coli* KS330 par exemple) ont une membrane externe plus perméable laissant passer des macromolécules (présence d'un halo) et d'autres ne possèdent pas cette caractéristique (absence d'un halo). Les protéines *sécrétées* pourraient aussi donner des halos bleus : la protéine de fusion est retrouvée à l'extérieur de la cellule bactérienne et le produit bleu peut alors diffuser dans la gélose. Il est à noter que le phénomène du halo bleu n'est mentionné que dans un seul groupe (Adler, B. *et al.*, 1999). En ce qui concerne les travaux discutés dans ce mémoire, des colonies avec halo ont été dénombrées : les fusions sont alors considérées comme étant sécrétées, attachées à la membrane externe ou périplasmiques.

En ce qui concerne les résultats obtenus, certains clones se sont avérés identiques. Il s'agit d'un phénomène tout à fait normal : la banque générée dans pHRM104 peut contenir

plusieurs copies d'un même fragment, étant donné le biais lié à la fragmentation d'ADN par enzyme de restriction.

Certains clones donnant des colonies bleues (avec ou sans halo) ne sont pas séro-réacteurs. Il est tout à fait normal que certaines protéines, bien qu'elles soient localisées de façon stratégique, ne réagissent pas avec le sérum : la réaction antigène-anticorps est dépendante de la conformation. De plus, la séquence en acides aminés pourrait être trop courte, ce qui peut entraîner l'absence d'épitopes. Le gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) n'est pas le support idéal pour conserver la conformation tridimensionnelle originale des protéines. À ce sujet, il existe toutefois des gels non dénaturants qui permettent de conserver les protéines intactes.

Un autre phénomène à mentionner est le faible rendement obtenu (peu de colonies) avec la souche CC118. Bina *et al.*, qui ont utilisé la fusion PhoA pour identifier des protéines sécrétées par *Helicobacter pylori*, ont aussi obtenu un faible rendement avec la souche CC118. Ils ont émis l'hypothèse que ce faible rendement pouvait s'expliquer par le phénomène de restriction : les enzymes de restriction de la souche CC118 détruisant l'ADN étranger inséré lors de la ligation. En ce qui concerne la souche DH5 α , le bruit de fond (l'activité PhoA) n'est pas suffisant pour empêcher son utilisation dans les expériences de fusion.

En ce qui concerne les tableaux des résultats pour les clones séro-réacteurs et non séro-réacteurs, le pourcentage d'identité réfère au nombre d'acides aminés présentant une similitude lors de l'alignement des séquences d'acides aminés. Toutefois, la fonction des protéines homologues identifiées par le logiciel GCG n'est pas toujours connue. En ce qui concerne les clones séro-réacteurs, plusieurs séquences démontrent une homologie avec des

protéines de *H. influenzae* (17 des 41 clones). Trois des 41 clones correspondent à des séquences déjà connues chez App (clones 1-12, 3-14 et 3-23), ce qui valide le système de fusion. En ce qui concerne les clones non séro-réacteurs, plusieurs clones présentent une homologie avec des protéines de *H. influenzae* et d'*E.coli*. Les protéines homologues sont, pour la plupart, des enzymes, des lipoprotéines, des transporteurs ou des protéines de la membrane externe.

Ma tâche ayant étant accomplie, la poursuite du projet PhoA a consisté à sélectionner et séquencer entièrement les clones les plus intéressants. Ce projet est toujours en cours à l'heure actuelle. Une avenue prometteuse pourrait consister en l'utilisation d'un nouveau vecteur (Mdluli *et al.*, 1995). Les plasmides pJDT1, pJDT2 et pJDT3, qui ont, pour le gène '*phoA*', les trois cadres de lecture possibles en plus du promoteur *plac*, augmentent par un facteur de trois la chance de cloner un gène particulier dans la bonne orientation et dans le bon cadre de lecture. Il s'agit donc d'un vecteur optimisé permettant d'identifier plus de protéines sécrétées à l'intérieur ou au-delà de la membrane cytoplasmique.

CONCLUSION

Une banque d'App 4074 a été créée dans le vecteur pHRM 104 : les fragments utilisés variaient de 0,5 kpb à 1,5 kpb. Après transformation dans la souche *E. coli* DH5 α , 8281 clones ont été obtenus. 94 colonies bleues (fusions positives) ont été dénombrées (rendement de 1,135 %). Parmi ces clones, 12 colonies avec halo ont été dénombrées. 41 des 94 fusions positives sont antigéniques (immunobuvardage de type Western avec un sérum de porc convalescent anti-sérotype 1). 61 des 94 clones ont été séquencés, dont les 41 clones séro-réacteurs. Après avoir comparé les séquences en acides aminés déduites avec celles de banques de données, plusieurs d'entre elles ont montré une homologie avec des lipoprotéines, des protéines de la membrane externe et des transporteurs particulièrement d'espèces bactériennes appartenant à la famille des *Pasteurellacea*. Puisque 43,62 % des clones ont réagi avec des anti-sérums de porcs convalescents à la pleuropneumonie porcine, cette technologie semble être adéquate pour mettre en évidence des antigènes pouvant entrer dans la composition d'un vaccin. Les gènes complets de plusieurs clones positifs sont en voie d'être isolés à partir d'une banque génomique d'App 4074 et caractérisés par immunobuvardage après leur expression protéique respective.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adler, B., Bulach, D., Chung, J., Doughty, S., Hunt, M., Rajakumar, K., Serrano, M., van Zanden, A., Zhang, Y., Ruffolo, C. (1999) Candidate vaccine antigens and genes in *Pasteurella multocida*, J. Biotech. 73 (1999) 83-90.

Barnaum, D. A. (1990) Socioeconomic Significance of the HAP Group., Can. J. Vet. Res. 54 : S1-S5.

Beaudet, R. McSween, G., Boulay, G., Rousseau, P., Bisailon, J.-G., Descoteaux, J.-P., Ruppanner, R., (1994). Protection of mice and swine against infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* by vaccination., Vet. Microbiol. 39, 71-81.

Beybon, L. M., Griffith, D. W., Richards, J. C., Perry, M. B. (1992) Characterization of the lipopolysaccharide O antigens of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 9 and 11: antigenic relationships among serotypes 9, 11 and 1., J. Bacteriol. 174, 5324-5331.

Bina, J, Nano, F., Hancock, R. (1997) Utilization of alkaline phosphatase fusions to identify secreted proteins, including potential efflux proteins and virulence factors from *Helicobacter pylori*., FEMS Microbiol. Letters. 148, 63-68.

Bossé, J. T., Johnson, R. P., Nemec, M., Rosendal, S. (1992) Protective local and systemic antibody responses of swine exposed to an aerosol of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1., Infect. Immun. 60, 479-484.

Byrd, W., Kadis, S. (1989) Structures and sugar compositions of lipopolysaccharides isolated from seven *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes., *Infect. Immun.* 57, 3901-3906.

Byrd, W., Kadis, S. (1992) Preparation, characterization and immunogenicity of conjugate vaccines directed against *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence determinants. *Infect. Immun.*, 60, 3042-3051.

Cruijssen, T. L. M., van Leengoed, A. M. G., Dekker-Nooren, T. C. E. M., Schoevers, E. J., Verheijden, J. H. M. (1992) Phagocytosis and killing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by alveolar macrophages and polymorphonuclear leukocytes isolated from pigs. *Infect. Immun.*, 60, 4867-4871.

Cruz, W. T, Nedialkov, Y. A., Thacker, B. J., Mulks, M. H. (1996) Molecular characterization of a 48-kilodalton outer membrane protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.*, 64, 83-90.

De Ley, J., Mannheim, W., Mutters, R., Piechulla, K., Tytgat, R., Segers, P., Bisgaard, M., Frederiksen, W., Hinz, K.-H., Vanhoucke, M. (1990) Inter- and intrafamilial similarities of rRNA cistrons of the *Pasteurellaceae*. *Int. J. Sys. Bacteriol.*, 40, 126-137.

Deneer, H. G, Potter, A. A. (1989a) Effect of iron restriction on the outer membrane proteins of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.*, 57, 798-804.

Deneer, H. G., Potter, A. A. (1989b) Identification of a maltose-inducible major outer membrane protein in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microb. Pathogen.*, 6, 425-432.

Devenish, J., Rosendal, S., Bossé, J. T. (1990) Humoral antibody response and protective immunity in swine following immunization with the 104-kilodalton hemolysin on *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Inf. and Immun.*, 58(12), 3829-3832.

Dom, P., Haesebrouck, F., de Baetselier, P. (1992a) Stimulation and suppression of the oxygenation activity of porcine pulmonary alveolar macrophages by *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its metabolites. *Am. J. Vet. Res.*, 53, 1113-1118.

Dom, P., Haesebrouck, F., Kamp, E. M., Smits, M. A. (1992b) Influence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 and its cytolytins on porcine neutrophil chemiluminescence. *Infect. Immun.*, 54, 575-582.

Dom, P., Haesebrouck, F., Kamp, E. M., Smits, M. A. (1994) NAD-independant *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains : production of RTX-toxins and interactions with porcine phagocytes. *Vet. Microbiol.*, 39, 205-218.

Euzéby, J. P. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. (1998)
<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/aa/pleuropneumoniae.html>.

Fenwick, B. W., Osburn, B. I., Olander, H. J. (1986) Isolation and biological characterization of two lipopolysaccharides and a capsular-enriched polysaccharide preparation from *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.*, 47, 1433-1441.

Fenwick, B. W., (1994) Lipopolysaccharides and capsules of the HAP group of bacteria. In : Donachie, W., Lainson, F. A., Hodgson, J. C., *Haemophilus, Actinobacillus and Pasteurella*. Plenum, New York and London, 101-113.

Frey, J., Beck, M., Nicolet, J. (1994a) RTX-toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In Freer, J., Aitken, R., Alouf, J. E., Boulnois, G., Falmagne, P. Fenrenbach, F., Montecucco, C., Piemont, Y., Rappuoli, R., Wadström, T., Witholt, B. (ed.), *Bacterial Protein Toxins*, pp. 322-332. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Germany.

Frey, J., Beck, M., Stucki, U., Nicolet, J. (1993a) Analysis of hemolysins operons in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Gene*, 123, 51-58.

Frey, J., Bosse, J. T., Chang, Y.-F., Cullen, J. M., Fenwick, B., Gerlach, G. F., Gygi, D., Haesebrouck, F., Inzana, T. J., Jansen, R., Kamp, E. M., Macdonald, J., Macinnes, J. I., Mittal, K. R., Nicolet, J., Rycroft, A. N., Segers, R. P. A. M., Smits, M. A., Stenbaeck, E., Struck, D. K., Van Den Bosch, J. F., Willson, P. J., Young, R. (1993b) *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxins: uniform designation of haemolysins, cytotoxins, pleurotoxin and their genes. *J. Gen. Microbiol.*, 139, 1723-1728.

Frey, J., Haldimann, A., Nicolet, J., Boffini, A., Prentki, P. (1994b) Sequence analysis and transcription of the *apxI* operon (hemolysin I) from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Gene*, 142, 97-102.

Frey, J., Kuhnert, P., Villiger, L., Nicolet, J. (1996) Cloning and characterization of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* outer membrane protein belonging to the family of PAL lipoproteins. Rés. Microbiol., 147, 351-361.

Frey, J., Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. (1995a) Trends in Microbiology, Vol. 3, No 7, 257-261.

Frey, J. (1995b) Exotoxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In : Donachie, W., Lainson, F. A., Hodgson, J. C., *Haemophilus, Actinobacillus and Pasteurella*. Plenum, New York and London, 75-87.

Gerlach, G. F., Anderson, C., Potter, A. A., Klashinsky, S., Willson, P. J. (1992) Cloning and expression of a transferrin-binding protein from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Infect. Immun., 60, 892-898.

Gerlach, G. F., Anderson, C., Klashinsky, S., Rossi-Campos, A., Potter, A. A., Wilson, P.J. (1993) Molecular characterization of a protective outer membrane lipoprotein (Oml A) from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. Infect. Immun., 61, 565-572.

Giladi, M., Champoin, C., Haake, D., Blanco, D., Miller, J. F., Miller, J. M., Lovett, M. (1993) Use of the blue halo assay in the identification of genes encoding exported proteins with cleavable signal peptides : cloning of a *Borrelia burgdorferi* plasmid gene with a signal peptide. J. Bacteriol., July, 4129-4136.

Gomez, M., Johnson, S, Gennario, M. L. (2000) Identification of secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis* by bioinformatic approach. Inf. and Immun. Vol. 68, No. 4, 2323-2327.

Haesebrouck, F., Chiers, K., Van Overbeke, I., Ducatelle, R. (1997) *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs : the role of virulence factors in pathogenesis and protection. Vet. Microbiol., 58, 239-249.

Haesebrouck, F., Van de Kerkhof, A. Chiers, K., Ducatelle, R. (1996) Interactions of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with alveolar epithelial cells. Proc. 14th Congress of the European Society of Veterinary Pathology, Ghent, Belgium, 87.

Hughes, M., Moore, J., Vckerman, P., Jones, A., Lane, J., Dobson, R., Wilson, R., Rubens, C., Feldman, R. G., Santangela, J. (1999) Group B *Streptococcus* vaccine candidates identified through signal sequence screening. Abstract D17, Microscience.

Inzana, T. J. (1990) Virulence properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Microb. Pathogen., 11, 305-316.

Inzana, T. J., Ma, J., Workman, T., Gogolewski, R. P., Anderson, P. (1988) Virulence properties and protective efficacy of the capsular polymer of *Haemophilus* (*Actinobacillus*) *pleuropneumoniae* serotype 5. Infect. Immun., 56, 1880-1889.

Inzana, T. J., Todd, J., Ma, J., Veit, H. (1991) Characterization of a non-hemolytic mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5: role of the 110 kilodalton hemolysin in virulence and immunoprotection. *Microb. Patho.*, 10, 281-296.

Inzana, T. J., Todd, J., Veit, H. P. (1993) Safety, stability and efficacy of noncapsulated mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* or use in live vaccines. *Infect. Immun.*, 61, 1682-1686.

Jacques, M., Roy, G., Mittal, K. R. (1988) Hemmagglutinating properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Can. J. Microbiol.*, 34, 1046-1049.

Jansen, R., Briaire, J., van Geel, A. B. M., Kamp, E. M., Gielkens, A. L. J., Smits, M. A. (1994) Genetic map of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxin (Apx) operons: characterization of the ApxIII operons. *Infect. Immun.*, 62, 4411-4418.

Jolie, R. A. V., Mulks, M. H. Thacker, B. J. (1994) Antigenic differences within *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Vet. Microbiol.*, 38, 329-349.

Kamp, E. M., Popma, J. K., Anakotta, J., Smits, M. A. (1991) Identification of hemolytic and cytotoxic proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by use of monoclonal antibodies. *Infect. Immun.*, 59, 3079-3085.

Kamp, E. M., Vermeulen, T. M. M., Smits, M. A., Haagsma, J. (1994) Production of Apx toxins by field strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Actinobacillus suis*. *Infect. Immun.*, 62, 4063-4065.

Kamp, E. M., Vermeulen, T. M. M., Smits, M. A. (1993) The importance of Apx I and Apx III for pathogenicity of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Med. Microbiol. Immunol., 182, 37.

Kilian, M. (1976) The haemolytic activity of *Haemophilus* species. Acta path. microbiol. scand., Sect. B. 84, 339-341.

Kilian, M., Biberstein, E. L. (1984) Genus II *Haemophilus*. In Krieg, N. R., Holt, J. G. (ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1, 558-569. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.

Kilian, M., Nicolet, J., Biberstein, E. L. (1978) Biochemical and serological characterization of *Haemophilus pleuropneumoniae* (Matthews and Pattison 1961) Shope 1964 and proposal a neotype strain. Int. J. Syst. Bact., 28(1), 20-26.

Kirby, S. D., Ogunnariwo, J. A., Schryvers, A. B. (1995) Receptor-mediated iron acquisition from transferrin in the *Pasteurellaceae*. In : Donachie, W., Lainson, F. A., Hodgson, J. C., *Haemophilus, Actinobacillus and Pasteurella*. Plenum, New York and London, 115-127.

Kobish, M., van den Bosch, J. F. (1992) Efficacy of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* subunit vaccine. Proc. 12th International Pig Veterinary Society Congress. The Hague, Netherlands. 216.

Lalonde, G., McDonald, T.V., Gardner, P., O'Hanley, P. D. (1989) Identification of a hemolysin from *Actinobacillus pleuropneumoniae* and characterization of its channel properties in planar phospholipid bilayers. J. Biol. Chem., 264, 13559-13564.

Larson, D. J., Anderson, G., McKean, J., Schultz, R., Stine, D. (1994) Porcine pleuropneumonia. http://www.vetinfo.net/sw_actin.html.

Lawhorn, B. (1998) Swine Pneumonia. Texas Agricultural Extension Service. The Texas A&M University System.

Lim, E. M., Rauzier, J., Timm, J., Torrea, G, Murray, A., Gicquel, B. Portnoï, D. (1995) Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA sequences encoding exported proteins by using *phoA* gene fusions. J. Bact., 177 (1). 59-65.

Martelli, P. Guadagnini, P. F., Foccoli, E., Ballarini, G. (1996) Efficacy of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* subunit vaccine in the control of pleuropneumonia : a field trial. Proc. 14th International Pig Veterinary Society Congress, Bologna, Italy, 214.

Mdluli, K.E., Treit, J. D, Kerr, V. J., Nano, F. E. (1995) New vectors for the in vitro generation of alkaline phosphatase fusions to proteins encoded by G+C-rich DNA. Gene, 155, 133-134.

Min, K., Chae, C. (1998) Detection and distribution of DNA of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the lungs of naturally infected pigs by in-situ hybridization. J. Comp. Path., Vol. 119, 169-175.

Mintz, K. P., Fives-Taylor, P. M. (1999) Identification of genes coding for exported proteins of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Inf. and Imm., 67, 6217-6220.

Mittal, K. R., Higgins, R., Larivière, S., Nadeau, M. (1992) Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pigs in Quebec. Vet. Microbiol., 32, 135-148.

Mittal, K. R. (1990) Cross-reactions between *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae* strains of serotypes 1 and 9. J. Clin. Microbiol., 28, 535-539.

Mittal, K. R., Higgins, R., Larivière, S. (1988) Quantitation of serotype-specific and cross-reacting group-specific antigens by coagglutination and immunodiffusion tests for differentiating *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae* strains belonging to cross-reacting serotypes 3, 6 and 8. J. Clin. Microbiol., 26, 985-989.

Mittal, K. R., Higgins, R., Larivière, S. (1983) Detection of type-specific antigens in the lungs of *Haemophilus pleuropneumoniae*-infected pigs by coagglutination test. J. Clin. Microbiol., 18(6), 1355-1357.

Mulks, M. H., Moxon, E. R., Bricker, J., Wright, A., Plaut, A. G. (1984) Examination of *Haemophilus pleuropneumoniae* for Immunoglobulin A protease activity. Inf. and Immun., 45(1), 276-277.

Negrete-Abascal, E. Tenorio, V. R., Serrano, J. J. Garcia, C., de la Garza, M. (1994) Secreted proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 degrade porcine gelatin, hemoglobin and immunoglobulin A. Can. J. Vet. Res., 58, 83-86.

Nesmeyanova, M. A. (1999) Polyphosphates and enzymes of polyphosphate metabolism in *Escherichia coli*. Biokhimiya.

Nicolet, J. (1992) *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In : Leman, A. D., Straw, B., Mengeling, W. L., D'Allaire, S., Taylor, D. J. Diseases of Swine. Ames, Iowa State University Press., 401-408.

Niven, D. F., Donga, J., Archibald, F. S. (1989) Responses of *Haemophilus pleuropneumoniae* to iron restriction: changes in the outer membrane protein profile and the removal of iron from porcine transferrin. Mol. Microbiol., 3(8), 1083-1089.

Oliaro, J., Johnson, R., Chen, W., Chadwick, V. Murray, A. (2000) Identification of an immunogenic 18-kDa protein of *Helicobacter pylori* by alkaline phosphatase gene fusion. J. Med. Microbiol., 49 (7) 643-650.

Oftek, I., Zafiri, D., Goldhar, J., Eisenstein, B. I. (1990) Inability of toxin inhibitors to neutralize enhanced toxicity caused by bacteria adherent to tissue culture cells. Inf. and Immun., 58, 3737-3742.

Paradis, S. E, Dubreuil, D., Rioux, S., Gottschalk, M., Jacques, M. (1994) High-molecular-mass lipopolysaccharides are involved in *Actinobacillus pleuropneumoniae* adherence to porcine respiratory tract cells. *Inf. and Immun.*, 62, 3311-3319.

Payne, M., Jackson, E. (1991) Use of alkaline phosphatase fusions to study protein secretion in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, Apr. 2278-2282.

Pearce, B.J., Yin, Y.B., Masure, H.R. (1993) Genetic identification of exported proteins in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.*, 9 (5), 1037-1050.

Perry, M. B., Altman E., Brisson, J. R., Beynon, L. M., Richards, J. C. (1990) Structural characteristics of the antigenic capsular polysaccharides and lipopolysaccharides involved in the serological classification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. *Serodiag. Immunother. Infect. Dis.*, 4, 299-308.

Pommier, P., Ridremont, B., Wessel-Robert, S., Keïta, A. (1996) Field study into efficacy of a new *Actinobacillus pleuropneumoniae* subunit vaccine. *Proc. 14th International Pig Veterinary Society Congress*, Bologna, Italy., 106.

Rapp, V. J., Munson, R. S., Foss, R. F. (1986) Outer membrane protein profiles of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Inf. and Immun.*, 52(2), 414-420.

Reimer, D., Frey, J., Jansen, R., Veit, H. P., Inzana, T. J. (1995) Molecular investigation of the role of Apx I et Apx II in the virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5. *Microb. Pathog.*, 18, 197-209.

- Rossi-Campos, A., Anderson, C., Gerlach, G. F., Klashinsky, S., Potter, A. A., Wilson, P. J. (1992) Immunisation of pigs against *Actinobacillus pleuropneumoniae* with two recombinant protein preparations. *Vaccine*, 10, 512-518.
- Rycroft, A. N., Cullen, J. M. (1990) Complement resistance in a *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection of swine. *Am. J. Vet. Res.*, 51, 1449-1453.
- Serebrin, S., Rosendal, S., Valdivieso-Garcia, A., Little, P. B. (1991) Endothelial cytotoxicity of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Res. Vet. Sci.*, 50, 18-22.
- Shope, R. E. (1963). Porcine contagious pleuropneumonia. *J. Exp. Medecine.*, 119, 357-368.
- Snyder, M., Elledge, S., Sweetseer, D., Young, R. A., Davis, R. W. (1987) Lambda gt 11 : Gene Isolation with antibody probes and other applications. *Methods in enzymology*, Vol. 154, 107-128.
- Suk, K., Das, S., Sun, W., Jwnag, B., Barthold, S. W., Flavell, R. A. et Fikrig, E. (1995) *Borrelia burgdorferi* genes selectively expressed in the infected host. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 92, 4269-4273.
- Tascon, R. I., Vasquez-Boland, J. A., Gutiérrez-Martin, C. B., Rodriguez-Barbosa, J. I., Rodriguez-Ferri, E. F. (1996) Virulence factors of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiologia SEM* 12.

Tascon, R. I., Vazquez-Boland, J. A., Gutiérrez-Martin, C. B., Rodriguez-Barbosa, J. I., Rodriguez-Ferri, E. F. (1994) The RTX haemolysins Apx I and Apx II are major virulence factors of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae* : evidence from mutational analysis. Mol. Microbiol., 14, 207-216.

Thwaites, R. N., Kadis, S. (1991) Immunogenicity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* outer membrane proteins and enhancement of phagocytosis by antibodies to the proteins. Inf. and Immun., 59 (2) , 544-549.

Utrera, V., Pijoan, C. (1991) Fimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pig respiratory tracts. Vet. Rec., 128, 357-358.

Valks, M. M. H., Nell, T., van den Bosch, J. F. (1996) A clinical fieldtrial in finishing pigs to evaluate the efficacy of a new APP subunit vaccine. Proc. 14th International Pig Veterinary Society Congress, Bologna, Italy, 208.

Van den Bosch, J. F., Jongenelenm I. M. C. A., Pubbenn, N. B., van Vught, F. G. A., Segers, R. A. M. (1992) Protection induced by a trivalent *Actinobacillus pleuropneumoniae* subunit vaccine. Proc. 12th International Pig Veterinary Society Congress, The Hague, Netherlands, 194.

Van de Kerkhof, A., Haesebrouck, F., Chiers, K., Ducatelle, R., Kamp, E. M., Smits, M. A. (1996) Influence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its metabolites on porcine alveolar epithelial cells. Infect. Immun., 64, 3905-3907.

Ward, C. K., Inzana, T. J. (1997) Identification and characterization of a DNA region involved in the export of capsular polysaccharide by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5a. Inf. and Immun., 65 (6), 2491-2496.

Williams, R. J., Ward, J. M., Henderson, B., Wilson, M., Nair, S. P. (2000) Rapid screening for putative exported proteins from *Staphylococcus aureus* using alkaline phosphatase as a reporter molecule. Mol. Biotech., Vol 15, 11-20.

Worley, W., Heffron, F. (2000) Identification of exported bacterial proteins gene fusions to *Yersinia pseudotuberculosis* invasin. Meth. Enz., 326, 97-104.